



Evolutionary Theory for

CONSTRAINED & DIRECTIONAL DIVERSITIES

Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 3 No. 2 (2019)

新学術領域研究

進化の制約と方向性

～微生物から多細胞生物までを貫く表現型進化原理の解明～



第4回理論情報交換会 第5回領域会議

第5回総括班、大規模解析支援班、国際活動支援班合同会議

第4回大規模情報解析情報交換会



表紙 リュウキュウヤマガメ *Geoemyda japonica*。真っ赤な婚姻色の美しい成熟雄。国指定の天然記念物。領域会議翌日にやんばる北部を探索中、北部外周道路上(国頭村 奥～伊江)に出てきた個体を発見。海岸沿いで生息に適した環境が周囲になく、このままでは轢死か海岸断崖を転落して死亡することが予想されたため、緊急保護して近傍の林道より内陸部に入り、良好な森林地帯に放した。沖縄本島北部山地を縦横に走る林道では貴重な野生動物のロードキルが問題になっており、警告標識(上左よりクロイワトカゲモドキとシリケンイモリ、ヤンバルクイナ、ヤンバルクイナ親子、リュウキュウヤマガメ、ケナガネズミ)が各所に設置されている。

(写真:産業技術総合研究所 深津武馬)

目次

新学術領域研究「進化の制約と方向性」

第4回理論情報交換会 第5回領域会議 第5回総括班、大規模解析支援班、国際活動支援班
合同会議 第4回大規模情報解析情報交換会 日程概要 1

領域代表挨拶 倉谷 滋 3

第4回理論情報交換会—公開講演会—

螺旋卵割の量的左右性と胸像体の進化力 浅見崇比呂 4

Homeorhesis について 金子 邦彦 5

計画研究班報告

脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性 倉谷 滋 6

脊索動物胚発生の分子発生システムゆらぎ測定と進化的保存性 入江 直樹 8

進化の揺らぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開 金子 邦彦 9

摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明 長谷部光泰 10

昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明」 深津 武馬 13

多様な選択圧下での大腸菌進化実験による揺らぎ—応答関係の定量解析」 古澤 力 15

公募研究班報告

胸鰭の鰭条本数の個体間ゆらぎ要因と種間形態多様性 田村 宏治 17

軟体動物割球特異化機構を題材にした発生システム浮動の方向性と制約の解明
守野 孔明 19

深層ネットワークを援用した表現型制約と表現型進化原理の探索と普遍構造の探求
小林 徹也 21

武器と性形質進化における発生の拘束と可塑性 岡田 泰和 22

骨化順序ヘテロクロニーの揺らぎと制約 小薮 大輔 24

酵素1分子の活性揺らぎと進化能の関係 上野 博史 25

脊椎動物の陸上進出による新奇形質の誕生—環境変化により揺らぐ形態形成経路に迫る—
田中 幹子 27

神経ネットワークの揺らぎは配偶者選好性の進化を規定しうるか 石川 由希 29

人工RNA進化システムを用いたRNAの構造揺らぎと進化の関係の解析 市橋 伯一 31

生態系の揺らぎ応答関係と内部進化の実験的解明 細田 一史 32

植物感染糸状菌の共生性と病原性を規定する分子の進化論的考察 晝間 敬 34

発現量揺らぎ—適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応—進化への影響

	守屋 央朗	36
ネットイツメガエル胚発生における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎ測定		
	安岡 有理	37
ゲノム倍数性がもたらす進化可能性～揺らぎと安定性の両立～	大林 龍胆	39
テントウムシ斑紋の揺らぎから探る表現型進化の制約と方向性	新美 輝幸	41
第4回大規模情報解析情報交換会		
	重信 秀治	43
国際活動支援について		
	入江 直樹	44
連載エッセイ(12) 灰皿		
	倉谷 滋	45



参加者集合写真

新学術領域研究「進化の制約と方向性」

第4回理論情報交換会 第5回領域会議 第5回総括班、大規模解析支援班、国際活動支援班合同会議 第4回大規模情報解析情報交換会
於 沖縄科学技術大学院大学 OIST シーサイドハウス 日程概要

4月22日(月曜)

第4回理論情報交換会—公開講演会—

9:00～10:20 浅見崇比呂(信州大)「螺旋卵割の量的左右性と胸像体の進化力」

10:20～10:30 休憩

10:30～11:50 金子邦彦(東京大)「Homeorhesis について」

12:00～13:00 昼食(総括班員は浅見先生意見交換会)

第5回領域会議(15分発表、5分質疑)

13:20～13:30 倉谷滋「領域代表始めの挨拶」

座長:古澤力

13:30～13:50 倉谷滋「脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性」

13:50～14:10 入江直樹「脊索動物胚発生の分子発生システムゆらぎ測定と進化的保存性」

14:10～14:30 金子邦彦「進化の揺らぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開」

座長:金子邦彦

14:30～14:50 長谷部光泰「摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明」

14:50～15:10 深津武馬「昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明」

15:10～15:30 古澤力「多様な選択圧下での大腸菌進化実験による揺らぎ—応答関係の定量解析」

15:30～16:00 休憩

座長:入江直樹

16:00～16:20 田村宏治「胸鰭の鰭条本数の個体間ゆらぎ要因と種間形態多様性」

16:20～16:40 守野孔明「軟体動物割球特異化機構を題材にした発生システム浮動の方向性と制約の解明」

16:40～17:00 小林徹也「深層ネットワークを援用した表現型制約と表現型進化原理の探索と普遍構造の探求」

座長:長谷部光泰

17:00～17:20 岡田泰和「武器と性形質進化における発生の拘束と可塑性」

17:20～17:40 小薮大輔「骨化順序ヘテロクロニーの揺らぎと制約」

18:00～20:00 交流会(沖縄科学技術大学院大学 OIST シーサイドハウス)

20:00～22:00 計画班会議(倉谷、金子、深津、古澤、入江、重信、長谷部)

4月23日(火曜)

座長:深津武馬

9:00～ 9:20 上野博史「酵素1分子の活性揺らぎと進化能の関係」

9:20～ 9:40 田中幹子「脊椎動物の陸上進出による新奇形質の誕生—環境変化により揺らぐ形態形成経路に迫る—」

9:40～10:00 石川由希「神経ネットワークの揺らぎは配偶者選好性の進化を規定しうるか」

10:00～10:20 市橋伯一「人工RNA進化システムを用いたRNAの構造揺らぎと進化の関係の解析」

10:20～10:50 休憩

座長:重信秀治

10:50～11:10 細田一史「生態系の揺らぎ応答関係と内部進化の実験的解明」

11:10～11:30 晝間敬「植物感染糸状菌の共生性と病原性を規定する分子の進化論的考察」

11:30～11:50 守屋央朗「発現量揺らぎ—適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応—進化への影響」

11:50～12:10 安岡有理「ネッタイツメガエル胚発生における転写因子—標的遺伝子関係の揺らぎ測定」

12:15～13:30 第5回総括班、大規模解析支援班、国際活動支援班合同会議

総括班代表:倉谷滋

総括班分担者:入江直樹、金子邦彦、長谷部光泰、深津武馬、古澤力、重信秀治

総括班研究協力者:郷通子、佐藤矩行、津田一郎、伏見譲、藤山秋佐夫

座長:倉谷滋

13:30～13:50 大林龍胆「ゲノム倍数性がもたらす進化可能性～揺らぎと安定性の両立～」

13:50～14:10 新美輝幸「テントウムシ斑紋の揺らぎから探る表現型進化の制約と方向性」

第4回大規模情報解析情報交換会

14:10～14:30 重信秀治「大規模解析支援 updates」

14:30～15:10 真野孔明「HiCによるゲノムアセンブリ」

15:10～15:20 入江直樹「国際活動支援について」

15:20～15:30 倉谷滋「領域代表終わりの挨拶」

領域代表挨拶

長く寒かった冬も終わり、元号も代わり、皆さん新しい気持で研究に邁進されていることと思います。この調子で、進化の謎を解き明かしてしましましょう。

ときに先日、小生『進化する形(講談社現代新書)』なる本を上梓し、そのなかでロシアの進化形態学者、アレクセイ・ゼヴェルツォフについて紹介しました。彼は、普通はいわゆる比較発生学者として認識される人物、自らは「ドイツ学派」と認識していたらしく、それに敬意を込め、ドイツ語読みの「ゼヴェルツォフ」といつも私は表記するのですが、ロシア語での発音はどうやら少し違うらしい。

とにかく、この人物は非常に自然な発想で、「系統樹の上を揺らいでゆく形態パターン」を発生学的に紐解き、あの「アルシヤラクシス理論」を世に問うた。が、これがすっかり忘れ去られ、のちにジョリーという比較形態学者がこれを再燃させようとしながら、ジョリーの哲学の非常に古典的で原型論的な部分が足を引っ張ったのか、それっきりになり、以来「岩波生物学辞典」にのみひっそりと居場所を見つけたような形になっていたわけです。

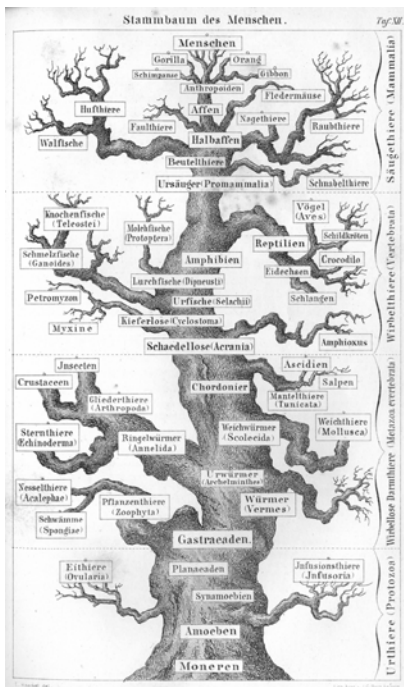
思えば、発生の中で揺らぐ部分がどこにあり、それが発生過程のどの時期にシフトするかが理解の鍵になる進化発生学において、ゼヴェルツォフの開拓した理論こそが、まさに最重要のセオリーではなかろうかというのが、拙著のメインメッセージのひとつであったわけです。

で、執筆中にもうひとつ気になったことがありました。それは、ヘッケルが1877年の『人類創成史』に発表した、この有名な系統樹についてです。たしかに系統樹のように見えます。が、よく見るとこの図の縦軸は時間ではありませんね。実はこれ、動物の体制(ボディプラン)の進化の度合い、つまり「グレード」の高低、もつという「下等から高等へ」という変化の系列を示すものになっているんです。まあ、確かに枝分かれはしていますから、「クレードとグレードをともに取り込んだ図」とでも呼ぶべきなのでしょうが(下等・高等の定義については、拙著をご一読下さい)。

その点、ダーウィンが『種の起源』に示した図は確かに系統樹です。それ以上でも以下でもない。そのダーウィンが、フォン＝ベーアの著作を読んで落書きしたことで知られる例の図も、紛れもなく系統樹で、もつというなら、1807年にラマルクが『動物哲学』の中で示した動物の関係図も、微妙だけどひょっとしたら系統樹です。というわけで、このヘッケルの有名な図を「世界で初めて示された進化系統樹」として認識するのは間違いじゃなかろうかというのが私の考え。おそらく、ヘッケルの頭の中では「連続的に変形してゆく発生プログラムが、次第にそのレベルを上げていき、さまざまな動物の形に帰結していった」という、基本的には終末付加のモデルに沿った形で、さまざまな動物の個体発生過程を重ねて表現したらこの図になってしまったのではないかと、そんな風に考えている今日この頃です。

というわけで、今年度もよろしくお願いいたします。

倉谷 滋(理化学研究所)



螺旋卵割の量的左右性と胸像体の進化的力

浅見崇比呂(信州大学学術研究院理学系)

個体発生の過程にみる形態形質の多くは、個体間で量的に異なる。この量的な個体差は、発生進化の研究パラダイムでは一貫してノイズとみなされてきた。このため、たとえば初期胚にみる形態形質が異なる集団(あるいは種・系統)がどのようにして進化したかを問う研究はあまり例をみない。螺旋卵割は、前口動物を二分する大系統の一つ(螺旋/冠輪動物)にユニークな発生様式である。受精卵が時計回りまたは反時計回りに分裂し、割球配置に依存して以降の遺伝子発現の左右極性が決まる。螺旋卵割の極性を左右する因子に突然変異が生じると、この割球配置が個体間で大きくばらつく。この量的な個体変異に初めて着眼した本研究により、その進化機能を直接に示す実験的証拠を示す。結果として、以下のパラドクスが氷解した。「螺旋(冠輪)動物のうち、体内受精する巻貝は、交尾器を体の側面にもつため、左右逆に発生すると交尾器の位置も逆になり、交尾する上で不利である。にもかかわらず、逆巻(内臓逆位)の種がくり返し進化した。一方、サザエなどの巻貝や他の螺旋動物は、放精放卵するか、または正中線で交尾するため、左右逆でも配偶に支障がない。ところが、内臓逆位の種は進化していない。

Homeorhesis について

金子 邦彦(東京大学)

ここしばらく生物学において状態の頑健性、homeostasis が関心を集めている。しかし進化—発生の問題を考える上では、最終状態の頑健性だけでなく、そこへ至る過程/道筋の安定性を考える必要がある。実際 Waddington は 60 年ほど前に homeorhesis という言葉をつくりこの問題を議論している。いまや人口に膾炙した、あの有名な後成的(epigenetic)地形とともに、発生過程をあらわすこの地形をボールがころがる過程の安定性として、この言葉は登場する。

状態の安定性に関しては、谷があってそこに落ちていくと考えればよく、力学系のアトラクター(ひきこみ先)として理解することがしだいに生物学者にも受け入れられるようになってきた。そして谷が枝分かれしていくつもの安定状態があれば、それぞれを分化した細胞タイプと結びつけることができる。

しかし Waddington の有名な地形をみると奥行軸があり、それとともに地形自体が変化していく。この奥行軸は発生過程の進行とみなせるのだろうけれど、そうすると単に谷の地形を与えてボールが落ちるという単一の力学系だけでは表現できない何かが要請されている。これはどう理解すればよいのであろうか。

一つの可能性は(x,y)2次元面上に地形があり、x方向(横)に対しては高低が急な谷がありy方向(奥行)に対しては緩く谷が変化する地形が備わっていると考えて、その上をボールが転がっていくと考えるものである。この場合、ではy方向の変化はなぜ緩いのか、それを表す遅い変数はいくつか、いかにしてそれは登場したのかが問題となる。これに関連しては香曾我部らによる発生過程の進化シミュレーションにおいて、しばしば遅く変化する遺伝子発現が進化的に現れていることが注目される。その遅い発現変化が他の発生過程を制御し、結果進化可能性も増していく。この意味では遅い変数の出現=緩く変わる奥行き方向は進化発生対応を考える上での重要な切り口となる。

2つ目の可能性は(上と類似しているが)地形自体がゆっくり変わる他の過程を考えて、その時間変化が奥行き軸を与えているとみなすことである。例えば発生とともに細胞数が増えていくと細胞間の相互作用がそれとともに変化し、結果、1細胞が感じる地形がじわじわ変わる、あるいは遺伝子発現に修飾を与える epigenetic 過程がありそれがゆっくりと変わって谷を深くするという考え方である。前者に関しては古澤、金子らの一連の細胞分化理論が対応し、後者も宮本らの理論モデルがある。

いずれの考えにせよ homeorhesis を持つ系が発生過程の遅い変化を含意しており、それにより(元来発生よりずっと遅いはずの)進化過程とがつながってくると考えられる。この過程の安定性を考えれば進化発生での反復や砂時計の問題を理論の土俵に乗せられるのだろう。

いまのところ、このような問題意識はまだ机上の空論の段階かもしれない。では実際の進化発生で何をみて、何を測れば homeorhesis を実験科学の問題として扱えるのだろうか、皆さんと議論したい。

脊椎動物の筋骨格系の形態進化に見る制約と方向性

倉谷滋、平沢達矢、Juan Pascual-Anaya（理化学研究所）

【研究目的・背景】脊椎動物の進化においては、筋-骨格間の結合に保守性が見られ、通常は「つなぎ変え」を経ずに多様化した、まれにそこから逸脱した例もある。本研究では、筋-骨格結合の「つなぎ変え」に注目し、胚発生における筋-骨格結合の成立機構に内在する揺らぎの実体を解明、発生上の揺らぎと進化的傾向の関連を明らかにする。

特に対象とするのは移動性体節筋(MMP筋と略 - 舌筋、四肢筋など)である。この筋は、*Lbx1* 遺伝子を特異的に発現する体節由来前駆細胞が長距離を移動後、発生後期に非体節由来の骨格要素と相互作用し、二次的に結合を樹立する。この過程には多分に揺らぎが含まれるはずであり、進化において筋-骨格結合の保守性の基盤が失われがちとなると予想される。

【2018年度研究計画】代表的な筋-骨格結合の進化的変化であるカメの胸筋がどのような発生機構の変化を伴って進化しえたのか解明するための機能解析実験を行う。その一例として、腱前駆細胞に発現する *Scx* や一部の筋前駆細胞の移動に関与する *Fat1* の発現パターンを、カメとそれ以外の四肢動物(ニワトリ、マウス、ニホンヒキガエル)で比較する。通常、羊膜類では胸筋が結合する胸骨がカメでは進化的に失われているが、胸骨を持つ動物において実験的に胸骨を除去した場合、胸筋がどのような結合関係を樹立するかを調べる。

【2018年度研究結果】組織学的観察と遺伝子発現パターン解析から、カメの胸筋は *Scx* を発現する腱前駆細胞を介在させずに腹甲領域の真皮に結合したのち、その真皮中で発生、成長する腹甲骨格へ二次的に付着することが分かった。胸筋と真皮の結合が生じる部分の真皮細胞は *Fat1* を発現し、先行研究で示されていた哺乳類の皮幹筋や表情筋のような真皮結合性の骨格筋の発生過程や、本研究で新たに明らかとなった四肢動物の舌筋の発生過程と同じ過程を経てカメの胸筋-真皮結合が樹立されていると示唆される。

同時に、ステージ 16 のニワトリ胚で胸骨が発生するレベル(第 21-26 体節レベル)の体壁葉を腰部レベル(第 27 体節レベル)の体壁葉と交換移植し、胸骨が発生しない領域で胸筋原基がどのようにふるまうかを調べた。この実験により、胸骨が発生しなくなることは確認できたが、通常胸骨が発生する体壁葉の内側領域に *Scx* 発現細胞は現れ、胸筋原基はそれに接するように分布し、*Fat1* を介在する真皮への結合は観察されなかった。これについては、胸骨が除去されても胸筋-胸骨結合を担う腱前駆細胞の発生は進み、胸筋原基は通常と同じふるまいをして腱前駆細胞との結合を進めたのかもしれない。

【2019年度研究計画】前年度のニワトリ胚移植実験では、胸筋-胸骨結合を介在する腱前駆細胞の発生は除去できていなかった可能性がある。そこで、2019年度は、ステージ 23 のニワトリ胚の前肢芽を別の胚の腰部に移植し、胸骨とそれに付随する腱前駆細胞が不在の環境での胸筋原基の挙動を検索する。ステージ 23 において、MMP筋の前駆細胞は前肢芽内にあり、胸筋原基はその後に前肢芽から体幹へ向かって伸長、移動していくので、この実験操作で胸筋原基を腰部の環境に置くことが可能である。

また、胚発生における筋-骨格結合の成立過程における揺らぎを検出すべく、ニワトリ胚を中心に、比較として両生類(アホロートル、ニホンヒキガエル)や魚類(トラザメ)をも用い、筋芽細胞の分化、分布、遺伝子発現の経時的変化に関するデータを集める。特に鰓下筋群と前肢筋群について、個々の筋ごとの発生タイミングの違いに注目し、先に発生する筋と後から発生する筋とで形態形成の可塑性に差異がないかを調べる。これらの MMP筋において筋芽細胞が個々の筋へ分かれる過程では、筋-骨格結合を介在する腱前駆細胞に加え、非体節由来の筋結合組織(筋周膜

等)の分化、分布の影響も大きいことが予想される。2019年度は、これら非体節由来間葉の分化、分布、遺伝子発現の経時的変化および血管系との関連性に関するデータも集める。

【今後の展望】これまでの研究で、カメの胸筋や哺乳類の表情筋、四肢動物の舌筋といった、進化上の筋-骨格結合の劇的な変更の背景には、腱前駆細胞の分布変化による「つなぎ変え」ではなく、腱前駆細胞を介在しない真皮への新規結合があったということが判明しつつある。裏を返せば、それ以外では筋-骨格結合は大規模に変化できないという制約があるとも考えられる。今後は、真皮性結合の進化的起源を突き止めるとともに、個々の筋の発生における機構的性質の差異について理解を進め、一部の筋が筋-骨格結合進化の制約を逸脱できた条件を明らかにすることを目指す。

脊索動物胚発生の分子発生システムゆらぎ測定と進化的保存性

入江直樹(代表・東京大)、内田唯(研究協力者・東京大)、上坂将弘(分担・理研)

【研究目的・背景】動物の発生過程の進化的多様性には、ある種の法則性が存在することが近年明らかになった。長年の予想に反して、発生段階のうち最も保存されているのは最初期ではなく、発生の途中段階(特に器官形成期)であるという法則性(＝発生砂時計モデル)が遺伝子発現情報の比較解析研究から判明した。この保存された器官形成期こそが、動物門ごとのボディプランを数億年スケールで強固に保存させてきた原因になったのではないかと考えられており、門ごとの型(タイプ)を指定するという意味からファイロティピック段階と呼ばれている。しかし、発生砂時計モデルが複数の動物門において成立することが示唆されているにも関わらず、なぜ器官形成期が保存されるのかについてその進化メカニズムは明らかになっていない。ボディプランは、長い進化スケールにおいて非常に変わりにくい「限られた多様性」の好例と考えており、本課題ではこの進化メカニズムを明らかにしたい。

【2018 年度研究計画】本課題では、脊索動物の進化において観察された発生途中段階の限られた多様性が生じた進化メカニズムを、発生システムの揺らぎや柔軟性・頑健性、そして複雑性といった観点から探索する。特に、有力とされている仮説の検証や、複数の脊索動物種における動物胚から、ゲノムワイドな遺伝子発現情報・エピジェネティック状態などを測定・解析しつつ、進化的保存との関連を探っていく。

【2018 年度研究結果】砂時計型の多様性を動物胚が示すことを説明する有力候補としては、ファイロティピック段階は攪乱に対して脆弱であるため、致死的表現型となりやすく、結果的に純化選択を経て保存されるという脆弱説があった。しかし、我々の摂動実験ではそれは支持されなかった(Uchida *et al.* EvoDevo 2018)。一方で、包括的な遺伝子発現情報解析を脊索動物8種で行ったところ、遺伝子の使い回しによる拘束(pleiotropic constraint)が寄与している可能性が浮上し(Hu *et al.* Nature Eco Evo 2017)、この進化メカニズム解明のため、制御領域の特性と多面発現性、そして進化的保存性の関連探索に着手した。また、発生を通して変化する制御領域のある種の階層性についても新たな発見があり、現在投稿準備中である(Uesaka *et al.*)。

【2019 年度研究計画】これまでの研究により、器官形成期の保存性を説明する進化メカニズムとして脆弱説が否定されたことに加え、そして多面発現遺伝子による拘束が寄与している可能性がみえてきた。これらを踏まえ、今年度はメダカとマウスを用いた胚発生過程における個体間差(揺らぎ)と、進化的保存、そして多面拘束との関連を探る。加えて、各動物門におけるボディプランと保存された器官形成期の細胞集団レベルでの関連を single cell seq で解析し、遺伝子発現情報レベルでの保存性とボディプランとの理解のギャップを埋めるための研究を開始する。また引き続き、発生過程における遺伝子制御領域の使われ方と進化の関連を昨年度取得した ATACseq データを解析することで、発生過程における進化的法則性の探索を進める。

【今後の展望】器官形成期の保存に寄与している進化メカニズムの1つとして、多面的な発現をする遺伝子群による多面拘束が働いている可能性がこれまでの研究で示唆された。連続相同構造物の進化的保存性が高いことも多面拘束によるものだと考えられているが、実はその具体的なメカニズムについてコンセンサスは得られていない。今後は、近交系を用いた個体間差の測定、そして攪乱への摂動を含む揺らぎの視点を加えた実験も行うことで、多面拘束の具体的なメカニズムの検証、そして器官形成期を保存に対する発生システム揺らぎの影響を調べる。またこれら一連の研究を通して、長い進化を通して変化に乏しい制約された表現型進化に対する理解を深める。

進化の揺らぎ応答理論の確立と多階層・発生過程への展開

金子邦彦(東京大)、藤本仰一(大阪大)

【研究目的・背景】 これまでノイズや環境変動による表現型揺らぎが大きいほど進化しやすいという、揺らぎ応答理論を定式化してきた。これを踏まえ、表現型進化の制約、進化しやすいという漠然としていた概念を定量的に表す理論を完成する。そのため生物状態を少数マクロ変数で記述し、それが遺伝的变化、環境変化でどう変化するかを地形で表した理論を構築する。次に複数種の集団が安定して共存しつつ進化できるかを理解すべく、相互作用をとりいれた階層進化理論を展開する。これにより、表現型可塑性と共生しやすさを定量的に表現する。第三に表現型を形作る発生過程が進化を通しどのように変化していくかを調べ、進化と発生の対応、発生過程の進化拘束を定量的に表現する。これにより、形態進化の方向性への理解を与える定量的進化発生学の道を開く。成果は一般向け講演、成書でも公表、表現型進化の新描像を広く世に問う。

【2018 年度研究計画】 表現型進化の方向性と拘束のシミュレーションと理論: 表現型進化が低次元に拘束されるかを求め、その理論を展開する。これをふまえてロバストネスと可塑性の関係を探る。またこれらを実験から得られる、遺伝子—表現型関係の進化との対応を探る。

階層進化理論: 分子—細胞の階層をまたがる進化の理論を展開し、特に遺伝と機能を担う分子の役割分化を明らかにする。個体—生態系の階層をまたがるシミュレーションを行ない、相互作用により多種が共存できるかを調べる。個体内に他個体が存在するモデルのシミュレーションを通して、共生が維持される条件、その進化的安定性を明らかにする。

進化発生対応の理論: (1) 発生過程を模した力学系モデルを用い、親子のパターンが類似するロバストネスに着目し、発生過程と進化過程の対応関係を調べる。特に、対応における遅いモードの意義を明らかにする。(2) 動植物の形態形成の各階層、すなわち、細胞集団(動物上皮や植物幹細胞)、器官形状(昆虫翅)、複数の器官(花びら)の空間配置において、発生過程の揺らぎと進化過程の対応関係を調べる。並行して計算機実験では、制約された揺らぎを産み出す発生過程のポテンシャルを可視化(レアイベントサンプリング)した上で、進化の方向性(進化シミュレーション)との対応関係を解析できる系の構築を進める。

【2018 年度研究結果】 (1) 表現型進化のポテンシャル理論: 古澤力との共同研究で、表現型が変動できる領域が状態空間内で低次元に落ちていることをシミュレーションで確認し、さらに、これを少数の遅く緩和するモードが生成されることで説明、また表現型進化の方向性を確認した。

(2) 階層進化理論: 分子—細胞—個体—個体集団の階層をまたがる進化シミュレーションと理論を進めた。特に、竹内信人との共同研究で分子/細胞レベルでの進化の相克により、情報を担う分子と機能を担う分子への対称性の破れが生じ、これが遺伝子の起源につながることを示した。

(3) 進化発生対応の理論: 発生過程を単純化したパターン形成モデルの進化シミュレーションを行い、進化—発生対応を調べ、この際(1)でもみたような遅いモードの生成が進化発生対応をうむこと、また、遅いモードにより進化しやすさが増すかを調べた。藤本グループでは、細胞から多細胞組織さらには器官にいたる階層の形態や配置に注目し、力学的あるいは幾何学的な性質の揺らぎや発生拘束を調べた。実験データの定量解析と数理モデルを連携することで、細胞の分裂面(長谷部班と共同研究)、多細胞組織中の細胞の形態や配置、器官の形態、および、器官の配置や数などにおいて、揺らぎを制御する仕組みを見いだしつつある。

【2019 年度研究計画】 表現型進化の方向性と拘束の理論: 触媒反応ネットワークモデルに加え遺伝子制御ネットワークそして統計力学のスピングラスモデルを用い、大自由度の表現型が進化により低次元に拘束されることの普遍性を明らかにする。タンパクのデータとの対応、また公募班の実験との比較も開始する。このような低次元構造の形成の理論を進め進化の方向性を理論的

に表現する。これらを表現型のロバストネスと可塑性と結びつけて議論する。さらには単なる突然変異だけでなく水平的遺伝子伝播や有性生殖における表現型の安定性を調べる。

階層進化理論：分子—細胞—細胞集団の階層をまたがる進化の理論を展開する。細胞内分子数がある程度以上になると遺伝と機能を担う分子の役割が対称性の破れで生じることを明らかにし、その条件を突然変異率と細胞内の分子数との関係で表し、その実験的検証の検討を始める。次に細胞と細胞集団の階層では細胞が有用成分をもらすことで多種共生が生じること、また多様化と可塑性の関係を明らかにする。最後に個体—社会の階層に対してはゲーム理論による搾取構造の形成、さらには階層的進化による婚姻構造の形成のシミュレーションを開始する。

進化発生対応の理論：発生過程を模した力学系モデルにより発生過程と進化過程の対応関係の研究を続け、入江班が見出している、発生砂時計仮説の生じる条件を求め、遅く変化する遺伝子発現の意義を求める。さらにエピジェネティック過程を考慮した発生、進化モデルの研究を推進する。藤本グループでは、主に、器官の数と配置の対称性について進化発生対応の研究を動物と植物で同時に進める。植物の花器官の数と左右対称な配置について、各系統の多様性を生み出す発生の特性を明らかにする。動物については、昨年度に構築したクラゲの放射対称な器官配置過程のライブ観察系を用いて、器官配置に現れる揺らぎを定量的に解析し、制約の有無を明らかにする。加えて、同じ刺胞動物に属しながら左右対称な器官配置を示すイソギンチャクについても、器官配置過程の計測系を立ち上げる。同時に、これまでに研究してきた花の器官配置過程の数理モデルを改良して、これら動物の器官配置モデルの構築を開始する。さらには、計画/公募班の各グループと共同研究を継続し、進化発生対応の研究を細胞から器官配置に至る様々なレベルで進める。

【今後の展望】

(1) 大自由度の表現型空間からいかに自由度の削減が生じてマクロなポテンシャル地形が生じるかを、タンパク・代謝・遺伝子制御・生態系の異なる階層で調べて、それらをつなぐ理論を定式化する。

(2) 階層性進化について統計力学と階層的 Price 方程式に基づいたスケーリング理論を完成させて、サイズ(分子数ないし個体数)に応じて情報機能分化が起こるかの理論を進め、これを細胞、多細胞生物、個体集団(社会)へ提供する。

(3) 発生の砂時計仮説とロバストネスの関連を明らかにする。また藤本グループでは各階層の形態の揺らぎと進化の方向性の間の対応関係を動物と植物で明らかにする。

摂動実験を用いた食虫植物の捕虫葉進化機構の解明

長谷部光泰、鳴川秀樹、Gergo Palfalvi、須田啓、玉田洋介（基礎生物学研究所）

【研究目的・背景】本研究では、フクロユキノシタの誘引、捕獲、消化、吸収を担う遺伝子を特定し、それらが、協調して進化しえた機構を「揺らぎ応答進化理論」で説明できるかを検証する。さらに、フクロユキノシタの温度依存的な捕虫葉形成に着目し、植物の温度感知に関わるクロマチン状態と協調的な表現型進化の関連を調べる。

【2018 年度研究計画】

〔課題1. 食虫性関連遺伝子の特定〕フクロユキノシタの捕虫葉形態形成機構を明らかにするため、葉形態形成関連遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションを行う。また、アグロバクテリウム法による形質転換系の確立を目指す。Palfalvi を中心にフクロユキノシタゲノムのリシーケンス、HiC 解析を行う。また、ハエトリソウ、コモウセンゴケの発生段階による比較トランスクリプトーム解析を行い、食虫性関連遺伝子の発現変動を解析する。ハエトリソウ、ムジナモ、コモウセンゴケのゲノム比較から、食虫性関連遺伝子がどのように進化したかを推定する。

〔課題2. 環境摂動による遺伝子発現応答の解析〕Palfalvi、鳴川を中心として、フクロユキノシタに環境摂動を与え、食虫性関連遺伝子の発現応答を測定することで「揺らぎ応答進化仮説」が食虫植物進化に適用可能かを検証する。異なる光条件（24 時間連続明、16 時間明 8 時間暗、8 時間明 16 時間暗）、培養温度（15°C、25°C）、栄養分濃度を変えた条件で食虫性に関わる遺伝子の方が、関わらない遺伝子よりも発現ゆらぎが大きいかどうかを調べる。

〔課題3. 温度感受に関わるクロマチン動態の解析〕食虫性関連遺伝子が共通のエピジェネティック制御を獲得して進化した可能性を検証する。

【2018 年度研究結果】

〔課題1. 食虫性関連遺伝子の特定〕フクロユキノシタにおける葉形態形成関連遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、捕虫葉でも平面葉と同様に向背軸決定遺伝子が発現していることがわかった。詳細に捕虫葉の細胞分裂様式を観察した結果、最初に向軸側 L1 層の細胞分裂が背軸側よりも停滞し、その後、内側の細胞層の細胞分裂も停滞することで、向軸側が窪んだ構造が作られるらしいことがわかってきた。また、サイトカイニンの外生投与で平面葉が誘導されることを発見した。アグロバクテリウム法による形質転換系確立のため、条件検討を続けている。フクロユキノシタゲノムのリシーケンス、HiC 解析のための実験条件を検討し、サンプル収集を終了した。平面葉と捕虫葉の発生段階を区分けしそれぞれ段階で RNA-seq 解析のための 224 サンプル収集を終了した。シングルセルトランスクリプトーム解析によって、pseudotime course を作り細胞系譜を推定することで食虫性に関わる遺伝子群を同定するため、核単離法を検討し外見上ほぼ純粋な核の単離に成功した。ハエトリソウ、コモウセンゴケの発生段階による比較トランスクリプトーム解析を行い、食虫性関連遺伝子の発現変動解析を行った。さらにハエトリソウ、ムジナモ、コモウセンゴケのゲノム比較から、食虫性関連遺伝子がどのように進化したかを推定した。その結果、モウセンゴケ科の共通祖先で 1 回、ムジナモで 3 回のゲノム重複が起こっていること、ハエトリソウではトランスポゾンが大幅に増幅していること、遺伝子数が被子植物の中では極めて少ないことなどがわかった。ハエトリソウとコモウセンゴケの捕虫葉発生段階における比較トランスクリプトーム解析から、葉形態形成に関わる遺伝子は通常の植物とあまり変化が無いこと、通常の植物では根で機能している遺伝子が葉でも機能しているらしいことなどがわかった。ハエトリソウの記憶機構がカルシウム変動によって担われているらしいことがわかったので論文作成の準備を行った。

〔課題2. 環境摂動による遺伝子発現応答の解析〕Palfalvi、鳴川を中心として、フクロユキノシタに環境摂動を与え、食虫性関連遺伝子の発現応答を測定することで「揺らぎ応答進化仮説」が食虫植物進化に適用可能かを調べた。これまでに、異なる光条件（16 時間明 8 時間暗、8 時間明 16

時間暗)、培養温度(15°C、25°C)、栄養分である窒素濃度を変えた条件、サイトカイニン投与、エチレン前駆体投与など、384 サンプルの収集を完了し、総括班支援活動において配列決定中である。予備的解析結果から、食虫性に関わる遺伝子の発現揺らぎが大きい可能性があることがわかってきたので、さらに詳細な解析を進めている。また、自然界に無いような環境条件下で培養すると、平面葉でも捕虫葉でも無いような葉が形成されることがわかった。

[課題3. 温度感受に関わるクロマチン動態の解析]Palfalviを中心に食虫性関連遺伝子が共通のエピジェネティック制御を獲得して進化した可能性を検証する。植物の温度感受に関わるヒストンバリエント H2A.Z の ChIP-seq のために、ヒストン H3、ヒストンバリエント H2A.Z、H3K27me3、H3K4me3 の免疫沈降反応を行い ChIP-seq 解析の準備を進めている。

【2019 年度研究計画】

[課題1. 食虫性関連遺伝子の特定]昨年度に引き続き、フクロユキノシタ捕虫葉形成過程における細胞分裂様式の詳細な解析を行う。シングルセルトランスクリプトーム解析で pseudotime course を作り細胞系譜を予想することで、誘引、捕虫、消化、吸収に関わる因子を推定する。苗状原基を用いた形質転換系の確立を目指す。またウイルス誘導遺伝子サイレンシング法による機能解析系確立も並行して進める。ハエトリソウ、コモウセンゴケ、ムジナモのゲノム比較の結果、ハエトリソウとコモウセンゴケの初期発生段階におけるトランスクリプトーム比較解析結果、ハエトリソウの記憶機構について論文を発表する。

[課題2. 環境摂動による遺伝子発現応答の解析]昨年度に引き続きフクロユキノシタに環境摂動を与え、食虫性関連遺伝子の発現応答を測定することで「揺らぎ応答進化仮説」が食虫植物進化に適用可能かを調べる。自然界で無いような環境条件でできる可能性がでてきた異常形態葉について、どのような環境条件で形成されるかをさらに詳細に検討する。

[課題3. 温度感受に関わるクロマチン動態の解析]食虫性関連遺伝子が共通のエピジェネティック制御を獲得して進化した可能性を検証する。

【今後の展望】食虫性の進化と揺らぎ応答進化仮説との関連を中心に、シングルセルトランスクリプトームなどの新技術を導入し、食虫性進化の分子機構を推定する。

昆虫—微生物共生可能性の探索と分子基盤の解明

深津武馬、古賀隆一(産総研)、細川貴弘(九州大)、重信秀治(基生研)、
二河成男(放送大)、西出雄大(農研機構)、松浦優(琉球大)

【研究目的・背景】 従来の共生研究はすでに高度に確立した共生関係を対象としてきたが、近年の研究により、環境中には特定の宿主生物、例えば半翅目昆虫のチャバネアオカメムシなどに潜在的な共生能力を有する自由生活性細菌が普遍的に存在することがわかってきた。このような環境中の「潜在的共生細菌」「共生可能細菌」の全貌を把握するとともに、既知の「必須共生細菌」や「任意共生細菌」と比較解析し、さらにはそれらを宿主昆虫に継続的に感染させて実験共生進化させることにより、共生進化の条件や可能性、さらにはその促進要因や制約機構を探る。またそれら実験データを理論生物学や統計物理学の観点から解析、統合することにより、共生進化と揺らぎ応答の関係について明らかにする。

【2018 年度研究計画】

- ・主要モデル系のチャバネアオカメムシに加え、他にも共生可能性進化実験モデルとして有用な可能性のあるカメムシ類およびその他の昆虫類について、野外採集による試料収集、実験室飼育維持手法の検討、共生細菌の単離、培養、実験操作法の開発などを行う。
- ・チャバネアオカメムシの共生細菌除去幼虫を日本各地から採取した土壌試料に曝露して、細菌感染により成長できた個体をスクリーニングすることで、環境中に存在する共生可能細菌群を網羅的に探索、分離、同定する。特に南西諸島の宮古島で特異な細菌叢が検出されたため、重点的に調査を行う。
- ・得られた共生可能細菌系統について順次ゲノム配列決定を行う。また感染宿主カメムシの中腸共生器官の RNAseq を行う。ゲノム配列データについてはアセンブルおよびアノテーションをおこない、完全ゲノム配列および遺伝子カタログを決定する。RNAseq データについては de novo アセンブリおよびアノテーションをおこない、宿主カメムシと細菌の双方について高発現遺伝子をリストアップする。それらについてプラスミドによる形質転換系、トランスポゾンによる遺伝子導入系、相同組み換えによる標的遺伝子破壊系の開発をおこなう。
- ・得られた異なる共生可能細菌同士、あるいは共生可能細菌と共生細菌 C, D, E...等を一定比率で混合して、表面滅菌卵塊から孵化した共生細菌除去幼虫に経口摂取させ、一定時間後に各細菌を定量的 PCR 法で定量することにより、細菌間の競争感染実験を実施して相対共生能力を評価する。このようにして異なるレベルの共生能力を示すさまざまな共生可能細菌系統を同定、準備する。
- ・このように同定した共生可能細菌に感染させた昆虫系統を飼育維持し、高い成長速度や大きな体サイズなどの指標に基づいて適応度の高い個体を選抜して、その次世代の孵化幼虫にその細菌を感染させることを継続的に繰り返して飼育維持をおこない、共生能力が向上するように人為選択をかけて進化実験をおこなう。
- ・異なるレベルの共生能力を示すさまざまな共生可能細菌系統や進化実験細菌系統を共生細菌除去幼虫に感染させて、感染密度、局在、垂直感染率、宿主共生器官の形態や大きさなどの表現型効果を定量的に評価する。それら定量値の平均、分散、揺らぎについて統計的に検討し、共生能力との相関解析をおこなう。

【2018 年度研究結果】

- ・特にツチカメムシ類およびキンカメムシ類について、重点的に共生細菌および共生可能細菌の同定、単離、培養、実験系開発等を実施して、それら細菌群の多様性について解明した。

- ・環境中に存在するチャバネアオカメムシ共生可能細菌群の網羅的な探索、分離、同定を特に南西諸島の宮古島と久米島で重点的に実施して、共生細菌 C が優先する特異な状況は、宮古島の一部の地点においてのみ見られることが判明した。
- ・ミカンキンカメムシの共生細菌 C、ミヤコキンカメムシの共生細菌 D、フタホシツマジロカメムシの共生細菌 E、土壌由来の共生可能細菌系統 X1a, X1b, X2a, X2b・・・等計 64 株について、ゲノム解析を進めた。
- ・上記のゲノム解析と並行して、これらの細菌をチャバネアオカメムシの共生細菌除去幼虫に感染させて、成長速度、羽化率、体サイズ、体色、共生器官の発達度合などの解析を実施した。
- ・これらの細菌に感染させたチャバネアオカメムシ系統を継続的に飼育維持して、共生進化実験の条件検討を進めた。
- ・その他、チャバネアオカメムシにおける細菌感染に応答する遺伝子群、特に免疫系遺伝子群の解析、他のカメムシ類の腸内共生細菌の解析、セミ類の共生細菌および真菌の解析、昆虫の退職に関わる分子機構および共生細菌の解析などを進めた。

【2019 年度研究計画】

- ・主要モデル系のチャバネアオカメムシに加え、他にも共生可能性進化実験モデルとして有用な可能性のあるカメムシ類およびその他の昆虫類について、野外採集による試料収集、実験室飼育維持手法の検討、共生細菌の単離、培養、実験操作法の開発などを行う。特にミヤコキンカメムシ、タイワントゲカメムシ、ツチカメムシ類について重点的に調査する。
- ・チャバネアオカメムシの共生細菌除去幼虫を日本各地から採取した土壌試料に曝露して、細菌感染により成長できた個体をスクリーニングすることで、環境中に存在する共生可能細菌群を網羅的に探索、分離、同定する。引き続き宮古島の各所多地点において重点的な調査を行う。
- ・得られた共生可能細菌系統について順次ゲノム配列決定、感染宿主カメムシの中腸共生器官の RNAseq を行い、細菌側と宿主側の双方について高発現する遺伝子群や共生能力に関わる可能性のある遺伝子群を洗い出し、特に免疫系遺伝子群や、高発現しているものや興味深い機能を有することが期待されるものについて機能解析を実施する。
- ・異なるレベルの共生能力を示すさまざまな環境由来の共生可能細菌系統の解析および同定を進める。それらを共生細菌除去幼虫に感染させて、感染密度、局在、垂直感染率、宿主共生器官の形態や大きさなどの表現型効果を定量的に評価する。
- ・前年度に引き続き、共生可能細菌に感染させた昆虫系統を飼育維持し、高い成長速度や大きな体サイズなどの指標に基づいて適応度の高い個体を選抜して、その次世代の孵化幼虫にその細菌を感染させることを継続的に繰り返した進化実験系を検討する。

【今後の展望】フィールドから実験室まで、ゲノムから適応度まで、環境細菌から潜在的共生細菌、任意共生細菌から絶対共生細菌まで、多様な共生のありかたの生態と進化の理解、その過程における揺らぎや制約の検出と解析に取り組んでいく。

多様な選択圧下での大腸菌進化実験による揺らぎ-応答関係の定量解析

古澤力(理研)、若本祐一(東京大)、津留三良(東京大)

【研究目的・背景】 生物システムは環境変動に応じて、柔軟にその内部状態を変化させ、新たな環境に対して適応・進化する能力を持つ。一方で、その表現型変化は任意の方向に起こるのではなく、そこには明確な制約と方向性が存在する。その制約と方向性が出現するメカニズムを明らかにすることは、無方向でランダムな多様化過程を前提とした従来の進化理論では説明することが難しいさまざまな現象を、統一的に理解する新たな進化理論の構築に繋がる。

そこで本研究課題では、大腸菌進化実験を用いることにより、表現型変化の制約と方向性の存在を定量的に明らかにする。それらのデータから、揺らぎ-応答関係がどのように成り立ち、そこから進化過程の抑制と方向性をどのように予測できるかを検証する。

【2018 年度研究計画】

(1) 多様なストレス環境下での大腸菌進化実験:

前年度までに、ラボオートメーションを用いた全自動の進化実験システムを用い、様々に異なるストレス環境下での植え継ぎ培養による進化実験を完了している。この進化ダイナミクスにおける表現型と遺伝子型のゲノムワイドな解析に基づいて、この進化の過程において拘束されている方向と、表現型の揺らぎの大きさがどのような関係にあるかを明らかにする。

(2) 顕微鏡観察による大腸菌遺伝子発現揺らぎと環境応答の定量:

それぞれの遺伝子を蛍光タンパク質で標識した大腸菌ライブラリを用い、顕微鏡観察により遺伝子発現揺らぎの大きさを定量する。

(3) 1 細胞計測系を用いた遺伝子発現揺らぎと環境摂動への応答の定量:

顕微鏡下での 1 細胞計測を行いながら、光遺伝学的手法を用いて遺伝子操作を行う系を構築する。この系を用いることにより、揺らぎの計測を行いながら、同時にゲノム配列への摂動とその応答を解析することが可能となる。

【2018 年度研究結果】

(1) 多様なストレス環境下での大腸菌進化実験:

表現型進化がどのように拘束されているかを明らかにするために、自動進化実験システムを用いた複数環境・複数系列での大腸菌の進化実験を行った。得られた 192 のストレス耐性株(48 環境×4 独立進化系列)の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、10 程度のクラスタに分類できることが示された。それらのクラスタは、様々なストレスに対する耐性・感受性を定量したデータにおけるクラスタと良く対応し、さらに一部のクラスタについては、固定された変異の種類とも良い対応を見せた。これらの結果は、様々に異なる選択圧で進化をさせたにもかかわらず、大腸菌の取り得る表現型が比較的少数のパターンに拘束されていることを示唆している。また、このデータセットにおいて、耐性株間の遺伝子発現量の変動の大きさ(分散)と、環境変動を与えたときの発現変動、そして同一環境での揺らぎの大きさに正の相関が存在することが見出された。この結果は、揺らぎ-応答理論の実証例となる。さらに、あるストレス A を添加した環境での進化実験で得られた耐性株と比較して、異なるストレス B の下で得られた耐性株の方が、ストレス A に対する高い耐性を持つ例が多く見出された。この現象が生じるメカニズムは明らかではないが、適応度地形が複雑な構造を持つことを示唆している。

(2) 顕微鏡観察による大腸菌遺伝子発現揺らぎと環境応答の定量:

個々の遺伝子の発現量が蛍光タンパク質で標識された大腸菌ライブラリを用いて、揺らぎと環境応答量を一細胞レベルで高速に計測できる実験系を開発している。現在までに、大腸菌ライブラリの改変と顕微鏡下多点計測のためのデバイス開発を完了した。

(3) 1 細胞計測系を用いた遺伝子発現揺らぎと環境摂動への応答の定量:

クローナルな集団内の一部の細胞が致死濃度の薬剤環境下で長期間生き続けるパーシスタンス現象について、 10^5 以上の細胞の薬剤応答を1細胞レベルで追尾計測できるシステムを構築した。それによる解析から、パーシスター細胞はしばしば提唱されていたように増殖をしないドーマント細胞とは限らず、集団の成長相や培養条件に依存して支配的な生存モードが変化することが示された。この結果は、表現型の揺らぎが環境応答に寄与することを示唆している。

【2019 年度研究計画】

(1) 多様なストレス環境下での大腸菌進化実験：

前年度までの結果を発展させ、計算機シミュレーションと理論解析を援用し、進化的な制約が出現するメカニズムと、その制約が表現型揺らぎとどのような関係にあるかを定量的に明らかにする。また、それに基づいて進化ダイナミクスを予測し制御する手法を開発する。

(2) 顕微鏡観察による大腸菌遺伝子発現揺らぎと環境応答の定量：

前年度までに開発したシステムを用い、大腸菌を用いて遺伝子発現量揺らぎの系統的な定量を行う。さらに、炭素源を変化させるなどの環境摂動を与え、発現量の平均値がどのように変化するかを解析する。

(3) 1細胞計測系を用いた遺伝子発現揺らぎと環境摂動への応答の定量：

前年度までに開発した、パーシスタンス現象の解析システムと、光遺伝学の手法を用いて遺伝子操作を行う手法を用いることにより、表現型の揺らぎの計測を行いながら、同時にゲノム配列への摂動とその応答を解析する。

【今後の展望】

これまで議論されてきた揺らぎ応答進化理論を踏まえ、入江班で見出された多面発現遺伝子の役割や、Homeorhesis などの動的な安定性を取り入れた制約進化理論を構築する。

胸鰭の鰭条本数の個体間ゆらぎ要因と種間形態多様性

田村宏治、阿部玄武（東北大学）

【研究目的・背景】 本研究は、「前肢の相同器官である胸鰭における、種内で鰭条の本数に部位的制約をもってゆらぎを起こす外的要因とその要因が標的とするカスケードを特定する」ことを目的としている。さらに、鰭条本数のゆらぎを生じる要因・標的カスケードと四足動物の指本数多様性形成との関係を示す。これらにより「種内でゆらぎやすい仕組みを用いていることで、同一部位から作られる構造の種間多様性や形態特殊性を生み出す可能性を高めている」という仮説を検証する。同一種内あるいは同一系統内における鰭条数ゆらぎを生じる外的要因を特定することは、本領域の中心命題のひとつである「表現型のゆらぎ」研究の典型である。鰭条数がゆらぐのは後方部位に制限されており、この部位は脊椎動物全体の付属肢形態の多様性を担っている部位に相関している。表現型のゆらぎと形態進化を議論する好適モデルのひとつとして、本計画は当該領域に貢献できると考える。

【2018 年度研究計画】

＊ 鰭条数ゆらぎが起こる時期・領域・過程の特定とゆらぎ外的要因候補の摂動実験

1-1. 鰭条数のゆらぎが起こる時期と領域を特定するためのツール作り

1-2. 鰭条数のゆらぎの原因となる時期・過程の特定

＊ 第一候補 (shh シグナル経路) の解析と網羅的他候補因子 (経路) の探索

2-1. 第一候補としての shh シグナル経路の機能解析

＊ 鰭条数ゆらぎの頑健性 (追加)

3-1. 鰭条完全切除時における鰭条再生の有無の解析

3-2. 鰭条が再生する場合の再生鰭条ゆらぎ度合いの発生時との比較

【2018 年度研究結果】 ゼブラフィッシュ胸鰭原基の発生過程を経時観察し、鰭条本数のゆらぎが生じる時期と生じ方の様式を特定した。また、鰭条形成領域に特異的に発現を見せる遺伝子トラップ系統のスクリーニングから、鰭条形成時に機能する遺伝子の候補をいくつか獲得した。さらに、数十種類の脊椎動物+無脊椎動物の遺伝子情報を用いた網羅的遺伝子配列種間比較から「魚類特異的遺伝子 (魚類しか持っていない遺伝子あるいは四足動物だけが失った遺伝子)」を複数 (およそ 80 個) 見出し、その中から今回のプロジェクトに関わるものをスクリーニングする準備を整えた。一方で、形成中の鰭条を内骨格原基ごと切断した場合に、それぞれ発生初期には再生するが中期頃から能力低下し、後期には再生しないことを新たに発見した。現在、鰭原基を再生させた場合に鰭条数がどのように再生するか (その場合にも鰭条数は発生時と同じように揺らぐのか) を経時観察している。また、四足動物における指数種間差に関する実験も進めており、shh 発現領域の機能維持が指数の多様性に大きな役割を持つことを見出した。

【2019 年度研究計画】 これまでに鰭条数のゆらぎが生じる鰭条の領域や時期について特定したため、本年度はその領域と時期に外的要因が影響を与えうるか、また、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わるかを調べる。外的要因としてはエサについて注目し、ビタミン A 欠乏餌を調合・給餌し影響を見る (エサ準備済み)。また、昨年度の研究により shh シグナル制御に関わるいくつかの遺伝子発現が鰭条形成期にも発現することが明らかとなるなど、鰭条数のゆらぎに shh シグナル経路が関わる可能性が示された。この結果をもとに、shh シグナルの可視化システムの作製の他、shh 機能亢進および抑制実験を行うことで、shh シグナル経路とゆらぎとの関係を明らかにする。さらに、昨年度に得た発生過程・再生過程に関するデータを分子的に理解するために、網羅的遺伝子発現解析を行うことで標的分子経路を網羅的に探索する。これらの解析と上記の本年度の研究計画における摂動実験や機能解析とを組み合わせた実験を、さらに進める。

【今後の展望】 この２年間で少なくともゼブラフィッシュにおける鰭条数ゆらぎを解析する基盤とそれをもとにした責任経路の特定、さらにその経路に影響する要因を見つけることができる。さらにその責任経路が機能している領域が四足動物において指数の種間差を生み出す原因となっているという相関関係も明らかにできる。今後(研究期間内およびその後)は、これらの成果をもとに他の魚種における鰭条数ゆらぎと特徴的なヒレ形態(たとえば感覚器官としても機能するといわれる胸鰭後端の鰭条が変化した遊離軟条)の形態形成を発生過程や分子レベルで比較し、「種内でゆらぎやすい仕組みを用いていることで、同一部位から作られる構造の種間多様性や形態特殊性を生み出す可能性を高めている」モデル系として本研究内容を発展させていきたい。

図 1. 鰭条数のゆらぎ

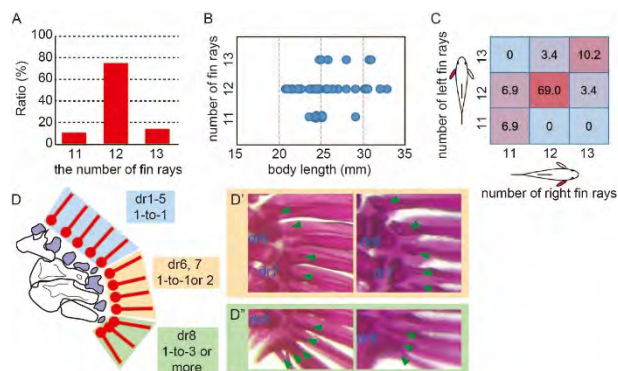


図 2. 鰭条数ゆらぎの系統間差

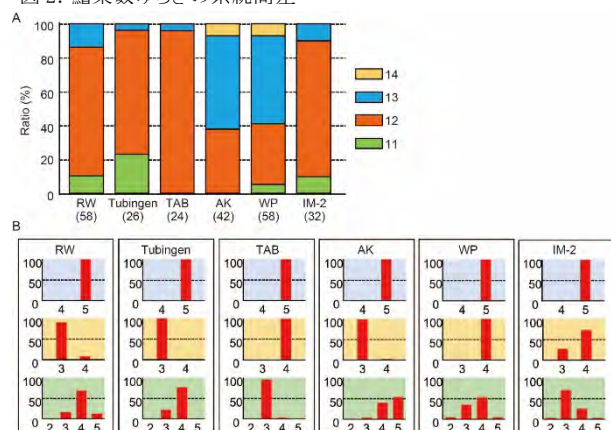
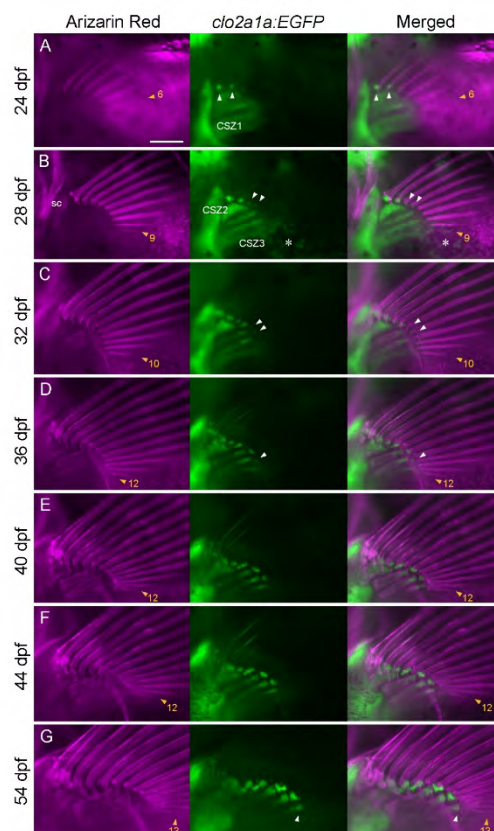


図 3. 鰭条数ゆらぎの形成過程



軟体動物割球特異化機構を題材にした発生システム浮動の方向性と制約の解明

守野孔明 (筑波大)

【研究目的・背景】 発生システム浮動は発生進化の源泉となる変異を生み出す。従って、発生システム浮動の方向性の理解は発生進化の方向性の理解へとつながる。近年、らせん卵割動物(軟体・環形動物など)にのみ存在する新規 homeobox 遺伝子群 SPILE が、動-植軸に沿って入れ子状に発現し、らせん卵割型発生の保存された特徴である動植軸に沿った割球運命分配に働くことを発見した。一方で、軟体動物腹足類の中でも遺伝子数や発現パターンに変動があり、他の転写因子に比べ変異に富むことも分かってきている。本課題では、腹足類 3 種を用いて初期発生期の転写因子発現プロファイルの相違点と、それに系統特異的転写因子がどう寄与しているかを、*in situ* hybridization とトランスクリプトーム、機能解析を組み合わせ検証する。これにより、数億年レベルで保存されている発生様式の背後にどの程度の浮動が許容されどのような傾向があるかを理解する。

【2018 年度研究計画】 保存された発生パターンを示す軟体動物カサガイ類 2 種、クサイロアオガイ (*Nipponacmea fuscoviridis*) とヨメガカサ (*Cellana toreuma*)、および古腹足類クロアワビ (*Haliotis discus discus*)を用いて、初期発生における転写因子の発現プロファイルおよび SPILE を含む系統特異的転写因子群のはたらきの比較を行う。2018 度の実験項目は以下の通りである。

(1) 1 細胞トランスクリプトーム: クサイロアオガイ、ヨメガカサおよびクロアワビの 16 及び 32 細胞期の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行う。まずは、実験的に扱いやすいクサイロアオガイで手法を確立することを目指し、その方法を他の種に応用していきたい。各生物で各割球群における遺伝子発現量を取得し、各生物種の各割球群(カルテット)で、どの転写因子が発現しているのかについての網羅的情報を構築する。

(2) SPILE 遺伝子群を中心とした転写因子群の発現パターンの解析: クサイロアオガイ、ヨメガカサ及びクロアワビの 32 細胞期において、SPILE を含む複数の転写因子群の *in situ* hybridization を行う。これにより、(1) SPILE 遺伝子群の発現パターンを網羅的に解明する、および (2) 1 細胞トランスクリプトームで得られた クラスターがそれぞれどの細胞に相当するのかを判断する、という 2 点を達成する。SPILE 遺伝子群だけでは全ての細胞タイプを分類するのに十分な情報でない可能性がある。そこで、軟体動物もしくは環形動物で幼生期に胚葉特異的に発現する転写因子群で、32 細胞期に発現している遺伝子を選択し、追加で解析を行う。以上の行程により、1 細胞トランスクリプトーム解析と *in situ* hybridization による情報を合わせ、どの割球細胞にどのような転写因子が発現しているのかを網羅的に理解する。

【2018 年度研究結果】 クサイロアオガイの 16 細胞期において、割球群(カルテット; 1q¹, 1q², 2q, Mac) を同定しながら割球を分離する手法を確立することに成功した。この手法を用いて、16 細胞期の 4 つのカルテット系列×3 biological replicates、合計 12 サンプルからそれぞれ Total RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成後、企業受託によってそれぞれ約 6Gb ずつのシーケンズデータを得た。得られたリードをフィルタリングした後、遺伝子モデルにマッピングし、各カルテット系列の遺伝子発現データを取得した。このデータをもとに、カルテット間で発現変動があり、かつ十分な発現量を持つ遺伝子を探索した結果、16 の転写因子が検出された。これらの遺伝子の *in situ* hybridization を行ったところ、16 細胞期においてカルテット特異的トランスクリプトームにみられた発現量の偏りと一致した発現パターンが観察された。このことは、一連の手法がカルテット特異的な発現を示す転写因子を同定する方法として機能していることを示す。ただし、16 細胞期の間に発現が局在していく遺伝子に関しては、上記の方法では検出できないことも分かった。また、

16 の転写因子群のうち SPILE を含む 5 遺伝子に関しては、過剰発現をすると実際に幼生の形態に影響を及ぼすことを確認している。

さらに、16 のうち 14 個の転写因子は、*orphan* 遺伝子、もしくはらせん卵割動物の分岐以降に重複した遺伝子であることが認められた。これらに相当する転写因子がヨメガカサおよびクロアワビで初期発生期に発現しているかどうかを、時系列トランスクリプトームおよび *in situ* hybridization を組み合わせて検証しているが、これまでのところでは必ずしも発現は保存されていないことが分かってきている。以上のことは、SPILE に限らず進化的に若い転写因子が卵割期に頻繁にリクルートされていること、それらの発現プロファイルは極めて変遷しやすいことを示唆する。

【2019 年度研究計画および今後の展望】 2018 年度に確立したカルテット特異的トランスクリプトームの手法を用いて、ヨメガカサおよびクロアワビのカルテットごとの発現プロファイルを解析し、3 種間でどれだけの違いがあるかを検出する。このデータの比較により、どの程度の分子経路の変化が発生パターンを変えずに許容されるのか、変えにくい / 変えやすい経路はどのような部分なのかということを明らかにする。また、各種で系統特異的転写因子の機能阻害もしくは過剰発現胚の RNA-seq を行い、ターゲット遺伝子を網羅的に同定することによって、SPILE 遺伝子を含む系統特異的な転写因子群の機能的な変遷と、それらが発現プロファイルの変遷/保存にどう寄与しているのかを明らかにすることを目指す。

深層ネットワークを援用した表現型制約と表現型進化原理の探索と普遍構造の探求

小林徹也(東京大 生産技術研究所)

【研究目的・背景】 本研究では、表現型ゆらぎを有する集団に普遍的に成り立つ変分構造と適応度ゆらぎ定理を基盤として、その結果に深層ネットワークに基づくモデル化と強化学習の知見を融合させることで、表現型制約と表現型進化の理論を発展させる。深層ネットワークを用いて抽象的かつ柔軟に表現型制約を表現し、深層強化学習の学習則から表現型進化過程のヒントと知見を得る。ネットワークの構造を工夫して、免疫系の表現型進化や1細胞複製過程の表現型制約・進化の問題にモデルを具体化する。シミュレーションを主体に探索的に得られた表現型進化の法則は、免疫受容体 NGS データや1細胞定量データなどを用いて検証を試みる。また、進化と深層強化学習の両者に共通して現れる変分構造を介して、統一的な理論の構築を目指す。その成果は生命進化の理解を深め、深層ネットワークの学習法などにも寄与すると期待される。

【2018 年度研究計画】 適応免疫系を対象として、環境に対する表現型適応の過程を強化学習の枠組みで定式化する。適応過程に存在する制約を深層ネットワークによってモデル化する。Q 学習やエントロピー制約 Q 学習などの知見を用いて、免疫ネットワークの学習則を導く。その学習性能をシミュレーションで検討しつつ、免疫学的な知見と比較することで、より生物学的に妥当な学習則の探索などを行う。平行して生物学的に妥当な更新則を考え、その強化学習の観点からの解釈も試みる。得られた適応ダイナミクスを主に数値的に解析し、学習過程および学習収束後のシステムの性質を調べる。その結果を T 細胞受容体の NGS シーケンスデータなどと比較することによって、得られたモデルの生物学的な妥当性を検証する。

【2018 年度研究結果】 深層強化学習の枠組みを利用して、T 細胞を中心とした獲得免疫系の強化学習による定式化を行った。Q 学習に対応する学習則にくわえシステムが満たすべき対称性を考慮することで、T 細胞のクローン選択理論と同一の学習則が導かれた。シミュレーションによってこの学習則が実際に変化する病原体のパターンを学習可能であることを確認した。また学習後に得られた T 細胞クローンの分布は実際に実験的に得られているクローン分布とかなりの部分一致し、また一致しない部分の原因として、ここの個体が経験する病原体の種数が異なることが影響していることをシミュレーションで示した。

【2019 年度研究計画】 獲得免疫系を対象に得られたモデルを更に発展させて、胸腺選択などより免疫学的に妥当な知見を加えるとともに、細胞複製系にターゲットを当てた理論の構築と応用を行う。具体的にはリボソームを中心とした複製ネットワークを考え、そのリソース最適化の観点から進化的拘束と適応の関係を調べる。またモデルの表面的な詳細によらない普遍構造を取り出すため、深層強化学習の変分構造に着目して情報や熱力学構造の観点から得られた結果を捉える理論的枠組みを構築する。

【今後の展望】 免疫系の各種問題との具体的な対応付や自己複製系の定量的性質の理解につながると嬉しい。

武器と性形質進化における発生の拘束と可塑性

岡田泰和(首都大)

【研究目的・背景】 カブトムシの角やクジャクの羽といった性選択形質は、ひときわ目を引く巨大で美しい“誇張された表現型”であり、こうした武器や装飾はすさまじい種内・種間の多様性を持ち、進化的・発生的に“変わりやすい形質”であることが知られている。一方、節足動物の交尾器や哺乳類の脳など、他の体モジュールは生育時の環境によらず、ほぼ一定のサイズに発生し、発生プロセスも環境や遺伝的摂動に対して頑健な作りになっていると考えられている。表現型の“ゆらぎ”と安定性を考える上で、1)環境依存的に形態形成が起こる表現型可塑性 および、2)武器や可塑性が部位特異的に生じるモジュール性、が重要なしくみであるがそのメカニズムはよくわかっていない。私は、武器をもつ昆虫をモデルとして、様々な体モジュールが、全体として機能的なパフォーマンスを持つよう統合的に発生する仕組みに興味を持っている。本研究では、オオツノコクヌストモドキという武器甲虫を主なモデルとして、武器をもたらす遺伝子、そして武器サイズに大きな“ゆらぎ”を許容する分子基盤の解明を目指す。

【2018 年度研究計画】 武器と他の体モジュールのあいだに発生的リンクをもたらすメカニズム解明にむけて、生態発生学的解析(RNAi などの実験的手法とトランスクリプトームによる、発生関連遺伝子の網羅的発現解析、形態計測学による変異性の評価)を行う。具体的には、栄養条件やオス・メス間、モジュール間で異なる形態発生をもたらす遺伝子を明らかにするため、飼育環境や性別の異なる個体の中で、発生過程で発現する遺伝子を網羅的に比較する解析(RNAseq)を行う。具体的に絞込みができてきた因子、とくに栄養依存的な発生・発達を制御するインスリン経路遺伝子については、部位や発生ステージを広く対象とした精緻な発生・生理学解析を RNAi, リアルタイム定量 PCR などを用いてすすめる。

【2018 年度研究結果】 シカやカブトムシの角など、性選択形質の大きな特徴は、体の一部の巨大化である。これに加え、性的な武器や装飾は、その発生・発達の過程で、体の一部が鋭敏に栄養状態に応答するように作られていることも大きな特徴である。性的形質が”個体の質を正しく反映する”という上で栄養応答性の高さは重要であり、種を超えた共通の性選択形質の特徴となっている。本研究では、オスが大アゴを武器として用いるオオツノコクヌストモドキ(*Gnatocerus cornutus*, 以下オオツノ)という甲虫を用いて、栄養応答性の主要なメカニズムのひとつと目されているインスリン経路に注目した。昆虫ではインスリンや受容体をコードする遺伝子は多様化しており、種によって数は異なるが、ほとんどの昆虫は複数のリガンドや受容体を持つ。本講演ではオオツノが持つインスリン経路の主要な遺伝子について、コピー数や配列を整理し、それらの発現解析や RNAi による機能解析により武器サイズを決める因子を特定した。インスリン経路は動物では広く保存されている、という見方が一般的だが、経路を構成する個々の遺伝子は多様化が進んでおり、その多様化が性的形質の獲得や多様化を促進した可能性について議論したい。

【2019 年度研究計画】 武器と他の体モジュールのあいだに発生的リンクをもたらすメカニズム解明にむけて、生態発生学的解析(RNAi などの実験的手法とトランスクリプトームによる、発生関連遺伝子の網羅的発現解析、形態計測学による変異性の評価)を行う。具体的には、栄養条件やオス・メス間、モジュール間で異なる形態発生をもたらす遺伝子を明らかにするため、飼育環境や性別の異なる個体の中で、発生過程で発現する遺伝子を網羅的に比較する解析(RNAseq)を行う。また、具体的に絞込みができてきた因子、とくに栄養依存的な発生・発達を制御するインスリン経路遺伝子については、部位や発生ステージを広く対象とした精緻な発生・生理学解析を RNAi, リアルタイム定量 PCR などを用いてすすめる。また、ゲノム配列解析を進め、リシーケンスなどによる系統間・種間比較を進めたい。

【今後の展望】引き続き、栄養応答遺伝子の特定と機能解析、ゲノム基盤の解析を進める。さらに、これまでの解析で、オス・メスの差をもたらす仕組みにもエピジェネティックな因子がかかわることがわかってきた。性形質の発現に関わる遺伝子とエピジェネティック因子の相互作用など、武器の性特異的な発現に関わるメカニズムについて、新規のメカニズムを解明し、部位特異的・性特異的な武器の発達メカニズムから形態変異が生じるしくみを解明する。

骨化順序ヘテロクロニーの揺らぎと制約

小薮 大輔 (武蔵野美術大学/ 京都大学)

【研究目的・背景】 脊椎動物の身体は数百の骨によって構成されているが、どの骨を先に、或いは後に形成するかという骨化順序は種によってほぼ決まっている。これまで代表者は独自に収集してきた 100 種以上の羊膜類(鳥類, 爬虫類, 哺乳類)の胚標本を用いて、頭部構成骨の骨化順序にみられる種間変異と制約的パターンを明らかにしてきた。骨化順序の種間変異は種内レベルにおける変異が成因となっていると想定される。加えて、当該新領域が掲げる「進化の揺らぎ応答理論」に従えば、種内レベルで骨化順序の変動幅が大きい骨は種間レベルでも骨化順序の進化的変動幅が大きいと予想される。しかし、骨化順序の種内変異についての知見は大きく不足しているため、種内変異動態と種間変異動態に相関性はあるのか現状では明らかでない。そこで本課題では、脊椎動物の全身骨格の形成タイミングに見られる種内変異と種間変異を題材として「進化の揺らぎ応答理論」の検証を構想する。これまで代表者は羊膜類における頭部形態の発生プログラムの種間差を明らかにし、発生プログラム改変の系統進化パターンとモジュール的制約性を明らかにしてきた。本課題をこれら網羅的探索型研究に続く理論検証型研究として位置づけ、当該新領域の各計画班の成果を相互参照しながら、「進化の揺らぎ応答理論」の検証を目指す。

【2018 年度研究計画】 2014 年以降新たに入手した 4 種の哺乳類を加え、合計 79 種の胎子の全身マイクロ CT 画像を材料とした分析を行う。なお、本研究で使用するマイクロ CT は今年度9月までに発表者の研究室に設置する。本機を用いて、未分析の胎子標本の撮影を進めるとともに、本課題は羊膜類において全身骨格の骨化順序を記載し、系統樹上にマッピングを行うことで哺乳類における骨化順序の進化史と制約性を明らかにする。

【2018 年度研究結果】 予定通りマイクロ CT を本研究室に設置することができ、入手済胎子標本の高解像度撮像を進めた。これにより 79 種についての全身骨格の骨化順序の記載を完了し、分析を行った。その結果、全身骨のなかで前肢指骨および後肢指骨、胸椎の進化速度が最も早いことがわかった。一方で、鎖骨および前肢手根骨の進化速度が最も遅く、哺乳類全体においてほとんど変異が認められず極めて保守的であることがわかった。他方、後肢足根骨は全身骨のなかで進化速度は平均的であり、連続相同であるはずの前肢手根骨とは対象的に進化的制約は緩いことがわかった。また、各種の生活史で比較すると、出生直後から自立行動ができる早成動物と未熟なまま生まれる晩成動物とで、四肢動物形成傾向が大きく異なることがわかった。

【2019 年度研究計画】 哺乳類全体における全身骨の比較解析がほぼ完了したので本年は論文発表に向けて執筆を最優先で進める。加えて、種内変異動態の実験を行い、種内変異と種間変異の相関関係の分析を進める。

【今後の展望】 種内変異動態の実験実行が今後の課題である。種内レベルで骨化順序の変動幅が大きい骨は、種間レベルでも骨化順序の進化速度が大きいのかを検証を進めていきたい。

酵素 1 分子の活性揺らぎと進化能の関係

上野博史(東京大)、野地博行(東京大)

【研究目的・背景】「同一の遺伝情報」を持つ細胞集団においても、個々の細胞の表現型には揺らぎが存在することが知られている。我々の最近の研究から、このような「表現型の揺らぎ」は、酵素 1 分子レベルでも生じることが分かってきた。つまり同一の DNA から合成した酵素 1 分子においてもその活性には揺らぎが存在するのである。このような「表現型の揺らぎの大きさ」と「進化」には相関があり、大きな揺らぎを示す表現型ほど進化速度が速くなるという理論が最近報告されている。しかしこの理論がどういった表現型や進化に適用できるかどうかは未だ自明ではない。そこで本研究ではマイクロチャンバーデバイスを用いた酵素の定量進化実験系を確立し、酵素 1 分子の活性揺らぎと進化能との関係を明らかにする。

【2018 年度研究計画】2018 年度にはまずマイクロチャンバーデバイスを用いた酵素の定量進化実験系を確立する。進化のモデル酵素には大腸菌由来の Alkaline phosphatase (ALP)を用いる。進化実験の手順としては、まずマイクロチャンバーデバイス内に ALP の変異 DNA ライブラリ・蛍光基質・無細胞タンパク質合成系の混合溶液からなる微小ドロップレットアレイを形成させる。するとこのドロップレット内の 1 DNA から合成された ALP が蛍光基質を分解する。この分解に伴う蛍光増加の傾きを定量し、傾きが高いチャンバーから 1DNA を回収し、PCR 増幅・シークエンス解析を行うことで、酵素活性の高い進化した ALP の DNA およびその配列情報を得る。予備実験ではこの一連のスクリーニングプロセスにより、活性の上昇した進化した ALP の取得に成功しているがその再現性および取得効率が良くない。そこで本年度では 1 分子 DNA のマイクロチャンバー内への封入、1 分子 DNA からの酵素発現・活性定量、1 分子 DNA の回収・増幅のプロセスに注目し、これらのプロセスの最適化を行う。

【2018 年度研究結果】1 分子 DNA のマイクロチャンバー内への封入および 1 分子 DNA からの酵素発現・活性定量においては、ドロップレット形成に用いるオイルやデバイスの流路設計が結果に大きく影響することが判明した。そこでそれらの最適化を行うことで、より均一に封入・酵素発現・活性定量が可能な条件を見出した。また 1 分子 DNA の回収・増幅においては、回収に用いるキャピラリーの径や PCR 条件の最適化を行い、プロセスの再現性を向上することに成功した。特に実験初期では、変異ライブラリに由来しないコンタミ DNA が検出されるという問題が頻繁に生じていたが、外部環境からの DNA の混入の防止やプライマー設計・PCR 手法を見直すことで解決した。さらに封入後の活性定量とデバイスからの 1DNA の回収を自動で行う自動回収装置を開発し、活性定量から回収までの自動化にも成功している。最終的に確立した実験系を用いて、野生型よりも活性の上昇した変異体を複数個取得することに成功している(最高約 40 倍)。これら活性の上昇した変異体の 1 分子活性分布を計測したところ、活性揺らぎの大きさは分子種によって様々な値を持つことが分かった。さらに活性によらずランダムにピックアップした変異体の 1 分子活性分布の計測も行ったところ、平均活性が低い変異体ほど活性揺らぎが大きくなる傾向が得られている。

【2019 年度研究計画】2019 年度には確立した定量進化実験系を用いて進化実験を繰り返し、より高活性な ALP へと複数代進化させていく。得られた各世代の変異 ALP の 1 分子酵素活性計測から活性揺らぎ幅を評価し、1 分子の活性揺らぎと進化能との関係を明らかにする。さらに活性揺らぎの異なる ALP 変異体を起点とした進化実験を行い、起点に用いる ALP の活性揺らぎ幅が ALP 分子の進化能にどう影響するのかを明らかにする。また高活性変異の選択による定方向進化だけでなく、中立変異や低活性変異選択を取り入れた非定方向進化をスクリーニングに取り入れた進化実験を行い、各進化の道筋における活性値の変動と活性揺らぎ幅との関係を明らかに

し、それらが進化能、特に進化の遅くなった最終世代の到達活性にどう影響するのかを明らかにしたい。

【今後の展望】これまで進化のモデル酵素には大腸菌由来の Alkaline phosphatase (ALP)を用いてきた。この酵素はホモ 2 量体で機能し、活性の発現には 2 つの単量体内での分子内ジスルフィド形成および亜鉛金属イオンの配位が必要である。これまでの 1 分子活性分布の計測から、合成された ALP 分子にはホモ 2 量体の片方が活性を持たないポピュレーションが存在することが分かっている。このような活性の Heterogeneity が存在すると、酵素の 1 分子活性分布の揺らぎを単純に評価することが難しくなる。そこで ALP 以外にも単量体で機能する進化モデル酵素の探索を上記計画と並行して進める予定である。最近、ある好熱菌由来の β -glucosidase が単量体で機能し、かつ 1 分子活性分布の計測が可能であることが分かったため、この酵素を第一候補に考えている。

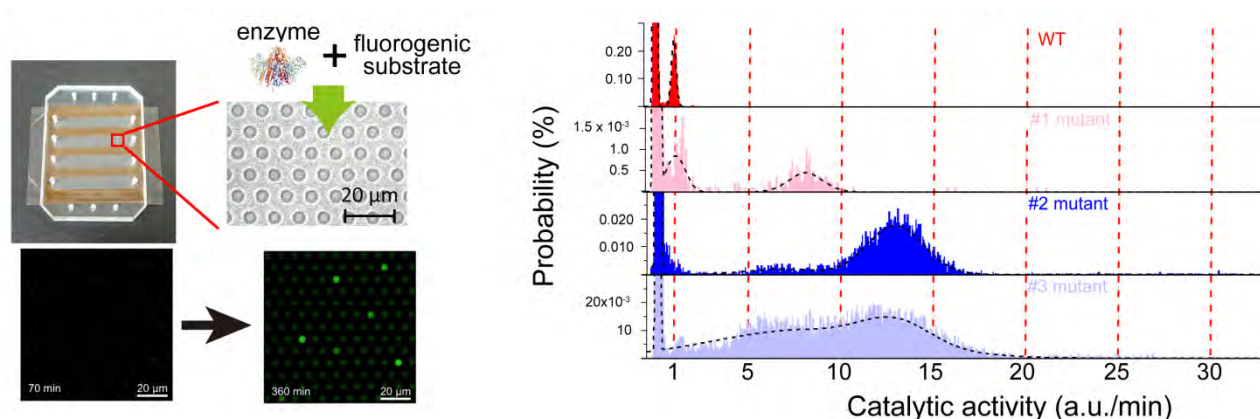


図 1. デバイス内での酵素 1 分子活性計測例(左)と進化実験で得られた変異体酵素の 1 分子活性分布(右)

脊椎動物の陸上進出による新奇形質の誕生 —環境変化により揺らぐ形態形成経路に迫る—

田中幹子(東京工業大学)

【研究目的・背景】脊椎動物は陸上への進出に伴い、高濃度の酸素環境に曝されることとなった。本研究では、上陸に伴う酸化ストレスによって、新奇形質を生み出した形態形成プロセスの揺らぎの解明を目指す。

羊膜類の四肢の形成過程では、指間領域の細胞がプログラム細胞死(以降、指間細胞死とよぶ)によって取り除かれ、指が分離する。一方、両生類アフリカツメガエル幼生の肢芽では、指間細胞死のシステムが確立しておらず、それぞれの指が伸長することによって分離する。このことから、指間細胞死は、脊椎動物が進化の過程で新しく獲得した形質であると考えられている。我々は、ニワトリ胚の肢芽の細胞死領域において、高レベルの活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)が検出されること、この領域での ROS の作用を阻害すると細胞死が抑制されることを確認している。

これらの背景から、我々は、指間細胞死が環境変化によって獲得された形質である可能性を考えた。本研究では各種脊椎動物をモデルに、酸化ストレスによってのみ指間細胞死という新奇形質が出現する系を用いて、四肢の形態形成プロセスの揺らぎを検出し、その分子機構に迫ることで、脊椎動物の上陸に伴う環境変化が新奇形質を生み出す原理を明らかにすることを目的とする。

【2018 年度研究計画】2018 年度は、環境酸素濃度によって大きく揺らぎ、生体内に ROS を大量に産生させうると考えられる経路のうち、(1)グルコース代謝の揺らぎが、新奇形質を獲得させた可能性を検証する。具体的には、高濃度酸素環境に曝されたことにより、代謝経路が好氣的リン酸化経路に切り替わり、ROS を大量に産生することになった可能性を検証する。この目的で、指間領域のメタボローム解析や、肢芽におけるグルコース代謝関連遺伝子の発現解析、及びグルコース代謝が細胞死に与える影響の検証を行う。

【2018 年度研究結果】(1) 高濃度酸素環境に曝されたことにより、代謝経路が好氣的リン酸化経路に切り替わり、ROS を大量に産生することになった可能性の検証を行った。この目的で、まず、細胞増殖期(HH28)と指間細胞死期(HH30, HH31)のニワトリ胚の肢芽の先端部領域について、メタボローム解析を行った。116 の代謝産物の定量結果を比較したところ、指間細胞死の開始後も TCA 回路の代謝産物量、ATP 量、及び、乳酸量に有意な変化は認められなかった。さらに、細胞増殖期と指間細胞死期の肢芽において、グルコース代謝関連遺伝子の発現解析を行ったところ、肢芽の発生過程では、細胞増殖期から指間細胞死期を通して、酸化的リン酸化によるグルコース代謝が行われていることが明らかとなった。そこで、当初の計画に加えて、(2) 血管形成との関連性についての検証も始めることとした。まず、ニワトリ胚を用いて、指間における血管形成段階と ROS と細胞死の関係を経時的に検証したところ、血管リモデリングがおこる場所で順番に指間での ROS レベルがあがり、細胞死が引き起こされることが明らかとなった。

【2019 年度研究計画】2018 年度までに、(1)グルコース代謝経路との関連性について明らかにしたので、2019 年度は、(2)血管形成との関連性について、さらに検証する。これまでの研究から、指間細胞死が検出される領域では血管網が発達していること、さらに人為的な血管網の発達により指間細胞死を誘発できることを確認している。血管網は、外傷などのストレスによって形態が大きく揺らぐ形質であるが、脊椎動物が高濃度酸素に曝されることと指間領域の血管網の発達との関連性、さらに、血管網の発達が ROS の産生を促す機構も不明であった。2019 年度は、これらの点を明らかにする目的で、① 酸化ストレスと指間領域における血管形成の関連の検証、及び② 指間領域における血管形成期に ROS の産生を促すソースの探索を行う。これらの研究によ

り、環境変化が四肢形成過程のどの経路の揺らぎに働き、指間細胞死という新しい形質を生み出し得たのか、その進化原理を明らかにする。

【今後の展望】 本研究課題で提案した研究を計画通り遂行することはもちろんのこと、領域内の共同研究を視野に入れ、新しい方向に研究を展開できる可能性についても議論していきたい。

神経ネットワークの揺らぎは配偶者選好性の進化を規定しうるか

石川由希(名古屋大学)

【研究目的・背景】 配偶者選好性の分化は種分化の重要な一步である。一方、配偶者選好性は種内でも大きなばらつきを持つ。この種内レベルの揺らぎから、種間で分化した配偶者選好性がどのように進化するのかは、生物の進化を理解する上で重要な命題である。動物の配偶者選好性は神経ネットワークに規定されている。神経ネットワークはゲノムや経験によって揺らぎ、配偶者選好性のばらつきを生む。この揺らぎからどのように種間の分化が生じるのだろうか？また揺らぎが分化に果たす役割はあるのだろうか？

キイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエはごく近縁でありながら、単一フェロモンへの選好性を逆転させた姉妹群である。近年、私たちはこの選好性を司る神経ネットワークを種間比較しネットワークに保存性の高い経路と低い経路が存在する可能性を見出した。これは神経ネットワークにまだ知られていない進化の法則性がある

ことを示唆する新たな発見である。神経ネットワークにおいて、重要性の高い経路の揺らぎは行動決定に致命的な欠陥をもたらす一方、それ以外の揺らぎはある程度許容されるであろう。このことから私は“神経ネットワークの重要な経路は揺らぎが小さく進化的に保存されており、それ以外の揺らぎの大きい経路の変化によって配偶者選好性の分化が実現される”と着想した。そこで本研究では、光/熱遺伝学による神経活動操作や神経接続の可視化などにより高解像度の神経ネットワーク比較を実現し、神経ネットワークの揺らぎと進化の関係を解明する。さらに豊富なゲノム情報や遺伝学的ツールを用いて揺らぎやすさを調節する分子機構を明らかにし、揺らぎを操作しながら進化実験を行う。これにより、神経ネットワークの揺らぎが配偶者選好性の進化を規定しうるかを定量的に検証する。

本研究では、ごく近縁でありながら、単一フェロモン 7,11-HD への選好性が全く異なるキイロショウジョウバエとオナジショウジョウバエを用いる。キイロショウジョウバエのオスは、メスの持つ 7,11-HD によって求愛を上昇させる。一方、オナジショウジョウバエのオスは、7,11-HD によって逆に求愛を低下させる。キイロショウジョウバエの 7,11-HD 選好性には、ppk23-P1 神経回路が寄与しており、この神経回路の活性化がオスの求愛を促進する。このことから、これら2種においては、ppk23-P1 神経回路が何らかの分化を果たしていることが示唆される。そこで本研究では、この ppk23-P1 神経回路を比較し、神経回路のどの部分が種間で保存され/分化しているのか、またどこが揺らぎやすいのかを明らかにし、上記の仮説を検証する。

【2018 年度研究計画】 2018 年度はまず、ppk23-P1 神経回路の形態や機能をキイロショウジョウバエと雑種(オナジショウジョウバエと似た 7,11-HD 選好性を示す)において比較する。まず各ニューロン群に GFP を発現させ、ppk23-P1 神経回路が相同なニューロン要素によって構成されているかを確認する。次に、各ニューロン群に光遺伝学ツールを発現させ、各ニューロン群の活性化が求愛行動にどのような影響をもたらすかを定量化する。これによりニューロン群の機能面において、ppk23-P1 神経回路のどこが種間で保存されているのかを明らかにする。次に、再構成 GFP を用いて神経接続を可視化する GRASP 法を用いて、ppk23-P1 神経回路の各経路の神経接続を定量比較する。GRASP ツールを発現させたハエの脳を解剖して GFP 抗体染色を行い、CMTK 画像ツールを用いて各個体の脳を標準脳にマップし、ImageJ ソフトウェアを用いて GRASP シグナルを定量する。これにより、ppk23-P1 神経回路のどの神経接続が保存され/分化しやすいのかを明らかにする。

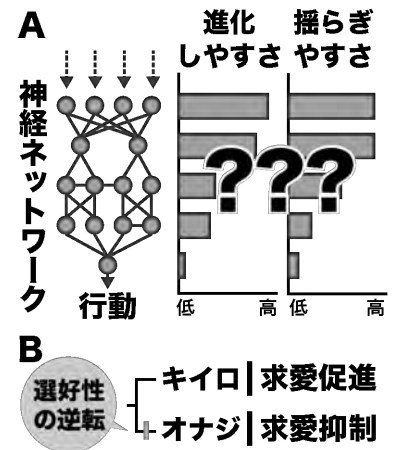


図1 (A) 本研究の仮説の概要
(B) ハエのフェロモン選好性の進化

【2018 年度研究結果】 ppk23-P1 神経回路を構成するニューロン群を可視化すると、キイロショウジョウバエと雑種のニューロン群の形態や細胞数はよく似ていた。このことから、全く異なる選好性を持つキイロショウジョウバエと雑種でも、ppk23-P1 神経回路を構成する要素は共通していることがわかった。さらに、光遺伝学ツールにより ppk23-P1 神経回路全体を人為的に活性化させると、キイロショウジョウバエの求愛が上昇したのに対し、雑種の求愛は抑制された。このことから、ppk23-P1 神経回路はキイロショウジョウバエと雑種で正反対の機能を持つことがわかった。ppk23-P1 神経回路の最下流に位置する P1 ニューロンを活性化すると、キイロショウジョウバエでも雑種でも求愛が促進された。このことから、最上流に位置する ppk23 ニューロンと P1 ニューロンの間のどこかに、神経回路の機能を逆転させる変化が存在することが示唆された。GRASP 法を用いて ppk23-P1 神経回路内の神経接続を可視化したところ、ほとんどの経路はキイロショウジョウバエと雑種で同レベルの GRASP シグナルを示したが、ある経路ではキイロショウジョウバエでは GRASP シグナルが観察された一方、雑種ではシグナルが観察されなかった。このことは、雑種において、特定の神経接続が失われている可能性を示唆している。さらにこの結果は、ppk23-P1 神経回路の中において、進化的に保存性の高い経路と低い経路が混在していることを示唆している。

【2019 年度研究計画】 GRASP 法による神経接続の可視化は簡便であるが偽陽性を含むことが報告されている。そこで 2019 年度はまず、GRASP 法により差異が見られた経路に関して、two-tagEM 法を用い、電験レベルでの神経接続の差異を確認する。またカルシウムイメージングを用いて、同定された神経接続の変化が、ppk23-P1 神経回路の機能の違いをもたらすことを実験的に示す。さらに、各経路の進化保存性と神経ネットワークの揺らぎやすさがどのように関係しているかを調べるため、交尾経験の有無やゲノム変異によってキイロショウジョウバエの各経路の神経接続がどのように揺らぐのかを、GRASP シグナルのばらつきを指標に定量し、進化保存性との相関を調べる。

【今後の展望】 神経ネットワークの進化保存性と揺らぎやすさの関係が明らかになったら、ゲノム欠損系統や RNAi 系統を用いて、揺らぎやすさを決定する分子を特定する。さらに特定した分子を用いて揺らぎを操作しながら進化実験を行い、神経ネットワークの揺らぎやすさと進化しやすさの因果関係を解明する。

人工 RNA 進化システムを用いた RNA の構造揺らぎと進化の関係の解析

市橋伯一（東京大）

【研究目的・背景】 生物進化の方向性に対する制約のひとつとして、揺らぎの大きな表現型が進化しやすいという傾向（揺らぎ応答理論）が提唱されている。しかしながら、未だ実験的な検証は十分ではなく、またその制約をもたらすメカニズムも明らかでない。そこで本研究では、これまでに行った進化実験における各段階の RNA 9 種類について、構造特異的 RNA ラベリング実験により構造とその揺らぎを正確に予測し、構造揺らぎと進化により変化した構造に関連があるかを直接検証する。さらに得られた結果から、揺らぎ応答をもたらす分子メカニズムを理解することを目指す。

【2018 年度研究計画】

1. 9 種類の RNA の全長について構造特異的 RNA ラベリングにより各塩基の対合率を測定する
2. RNA ラベリングのデータを用いて RNA の構造分布を求める

【2018 年度研究結果】 1について、9 種類の RNA の全長について構造特異的 RNA ラベリングにより各塩基の対合率を測定した。RNA の表現型（構造）ゆらぎを測定するために、構造特異的 RNA ラベリングを RNA 全長にわたって実施した。結果を RNA 配列に対応付け、RNA の各塩基が対合を形成する割合を求めた。できるだけ精度を高めるために、同一 RNA について複数回の実験を行った。2について、RNA ラベリングのデータを用いて RNA の構造分布を求めた。RNA ラベリングデータを制約条件に用いて、各 RNA のとりうる構造とその安定性を計算した。この解析により、多くの取りうる構造とその存在割合（すなわち構造分布）を求めた。

【2019 年度研究計画】 昨年度までに得られた構造分布を解析し、構造揺らぎと進化により変化した構造の関係性を検証する。具体的には、進化により選ばれた構造が元の分布にふくまれているかどうかを全ての進化過程で検証する。さらに得られた結果が RNA 構造予測によるアーティファクトではないかを検証するために、他の RNA 構造予測アルゴリズムも試す。また、RNA ラベリング実験のアーティファクトではないかを検証するためには、RNA ラベリングの測定データを使わない条件での構造予測でも同様な現象が起きているかを検証する。

【今後の展望】 以上の解析により、構造ゆらぎと進化のパターンが見出されたならば、上記の RNA 9 種類以外の RNA にも適応することを目指す。進化の途中には合計 91 種類の RNA が出現している。これらすべてについて揺らぎを解析し、上で見られたパターンが一致しているか、別のパターンが見えてこないかを検証する。予想としては、進化の最初と最後では構造揺らぎが別のパターンになるのではないかと考えている。例えば、進化の初期では揺らぎはどんどん小さくなり、最も適応度の高い構造へ収束していき、それ以上適応度が高くなれなくなると、大きな構造変化が起こるのではないかと予想している。

生態系の揺らぎ応答関係と内部進化の実験的説明

細田一史(大阪大)

【研究目的・背景】 生物は内部にも外部にも複雑なネットワークを有する階層構造の中に存在し、生物の進化はこの内部構造による制約と、外部生態系での選択圧の両面に制限される。よって進化の理解には階層をまたぐ必要であり、異なる階層を同じ理論で記述できれば大きく前進する。外部適応の原理である自然選択は分子・個体・生態群集と異なる階層で働くことが明らかだが、内部制約の原理は明らかでない。生物の階層において、内部構造制約を表現する「揺らぎ応答理論(短期的な揺らぎと長期的な変化の関係)」があるが、異なる階層への適用は明らかでない。もしこの理論が生態系にも適用可能なら、分子から生態系をまたぐ理論へと発展し、自然選択などを含む統合理論の構築が飛躍的に進歩する。また人類の緊急課題である生態系変化の理解も躍進する。本研究では、実験生態系における揺らぎ応答理論と、その生態系内部の生物進化を解析することで階層をまたぐ進化の理解を目指す。

【2018 年度研究計画】 27 種の微生物を混合した実験生態系を用いて短期的な揺らぎと長期的な変化の関係を解析する。本研究全体としては下記 6 項目を行う。

- (1) 多様性などがある程度保ち継代培養できる条件を 4 条件だけ探索する。
- (2) 4 条件それぞれについて、約 100 の反復実験を行い、分散(短期的な揺らぎ)を測定する。
- (3) 4×100 個の実験生態系を約 100 世代相当継代して長期変化を測定する(進化実験)。
- (4) 実験生態系の様々なパラメタの変化から短期的揺らぎと長期変化の関係性を解析する。
- (5) 進化実験の前後において大腸菌を単離し、遺伝子や表現型の変化を測定する。
- (6) 以上を説明する数理モデルの構築を試みる。

この中で、2018 年度には以下のように(1)～(3)を行う。

- (1) 培養条件の選択: 実験生態系が比較的多様性を保ち安定となる条件を選ぶ。様々な条件(振盪と静置、光や温度の強度、炭素源濃度、その他栄養濃度など約 400 通り)を検討する。
- (2) 生態系の短期的な揺らぎを計測: 上記 4 条件のそれぞれについて、24 反復の培養を1週間行い、約 40 次元のそれぞれの測定量に対して分散を求める。
- (3) 継代培養: 4 条件の実験生態系を継代する。2018 年度はこれの開始であり、2019 年度に引き続いて 100 世代おこなえるよう、培養および継代方法や測定方法を確立する。

【2018 年度研究結果】 上記計画を遂行する中で、2018 年度に得られた結果は以下である。

- (1) 実験生態系が比較的多様性を保ち安定となる条件を見つけ出した。当初の予定にある条件に加え、2018 年度での新学会会議においてコメントいただいた空気交換の有無も試した。地震の影響もあり当初の予定以上に様々な条件を試すことになったが、その分だけ理解は得られた。
- (2) 生態系の短期的な揺らぎと、遷移過程での変化の関係を、以降のプレ実験の意味も含めて観測した。遷移過程での変化とは、27 種をまぜた直後から、ある程度の安定状態に向かうまでの変化のことである。具体的には、48 種類の異なる培養条件である実験生態系について調べた。なお揺らぎ応答理論は、この遷移過程での変化を記述するものではない。結果、やはり分散と変化に明確な関係は見られなかったが、統計上有意な相関はあった。その他、これらの平均値や分散の関係などを調べた。
- (3) 継代培養の方法を確立した。特に、手作業の継代によりブレがあったところを、ロボットを導入することにより Well 間誤差が小さくなるようにした。また培養容器やシーリング、光の当て方など、できる限り Well 間誤差がなくなるようにした。これにより継代を開始している。
- (6) 生態系内部のダイナミクスに関し、非線形力学理論に基づく数理手法を利用することで、実験データから生態系の状態変数それぞれの関係性を調べることができるようになった。予定にはなかったが、ダイナミクスを理解するうえで非常に強力なツールになる手ごたえを感じている。

【2019 年度研究計画】

- (3) 継代培養の続き。4 条件×100 反復の実験生態系を 100 世代相当継代し、継代による長期変化を測定する。最終的な変化だけでなく、多変量の連続的な変化をトレースすることもできる。
- (4) 継代初期状態における反復実験での各測定量の分散と、この長期変化の関係を解析する。すなわち、生態系レベルの階層に揺らぎ応答理論は適用可能なのかに答える。実際には、どういった測定量(状態量)がこの理論に従うのか、その適用範囲を解明する。
- (5) それぞれの生物は 100 世代程度継代されるが、大腸菌や酵母の過去の進化実験ではこの程度でもゲノムに変異が入ることが知られているため、進化が期待される(最初の変異は効果が高いことも知られている)。この生態系の中でのゲノム変化や単離後の表現型の変化を調べる。
- (6) 生態系レベルの揺らぎ応答理論について、なぜその結果がえられたのか、生態系内部のダイナミクスを考慮した数理モデルを用いて、その理解を得る。具体的には、上記のデータ解析によりデータ駆動型の客観的モデルを得て、これを参考にして、実験結果を説明することができる主観的な動態力学モデルを構築することで、単純明快な理解に挑戦する。

【今後の展望】 以上のように、計画は予定通りに進める。またこれに加えて、新しいデータ解析手法や、2018 年度の領域会議や勉強会においてヒントを得た実験及び大規模実験解析など、予定外の好影響も感じているため、今後も機会を活かしていきたいと考えている。

植物感染糸状菌の共生性と病原性を規定する分子の進化論的考察

晝間敬（奈良先端科学技術大学院大学）

【研究目的・背景】 植物と微生物の相互作用研究において、寄生(病原)性と共生性の境を理解することは重要命題の一つであるが、これまで特に分子遺伝学的な知見が非常に乏しい。本研究では、植物根に感染する糸状菌が、同種でありながら同一宿主に対して片や共生型、片や寄生型という好対照的な進化の方向性を決定する因子の同定・解析を目的とする。

糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) は様々な地域・植物から単離されている。モデル植物シロイヌナズナから単離された *Ct* は貧栄養条件下でアブラナ科植物の生長を促す (Hiruma *et al.*, Cell 2016)。一方で、日本で単離された *Ct* の1株はシロイヌナズナの生長をむしろ阻害する寄生型菌であることを見出し、異なる地域・植物への適応進化の結果、*Ct* 株間の感染戦略は同種という制約のもとでも共生型から寄生型まで幅広く変化することが推察された。

そこで、同種でありながら多彩な感染戦略を示す *Ct* 株間での比較ゲノム解析と *Ct* 株の植物感染時のトランスクリプトーム解析を行い、植物感染糸状菌の感染戦略の可塑性のメカニズムや、その進化の方向性を決めた因子の絞り込みを目指す。次に、絞り込んだ菌・植物因子に関して、遺伝子欠損変異体を作成し解析することで、その機能を明らかにする。さらには、様々な進化圧を宿主植物内で与えることで、*Ct* を実験室内でそれぞれ(共生か寄生)の表現型を強める方向に進化させることが可能であるか検証する。上記の解析結果を組み合わせることで共生菌の進化の方向性を、*Ct* 株内と *Ct* 株間の遺伝子発現や表現型の揺らぎから予測できないか考察する。

【2018 年度研究計画】

1. シロイヌナズナに対して多彩な感染戦略を示す *Ct* 株およびその近縁菌株を同定する。
2. 対照的な感染戦略を示す菌株の全ゲノム情報をそれぞれ取得する。
3. *Ct* 菌株が宿主植物の根に感染中のトランスクリプトーム解析を行い、感染戦略が異なる菌株間で遺伝子応答パターンが異なる遺伝子群を絞り込む。
4. 共生型 *Ct* 株が病原菌化する変異体、及び、その共生能がさらに強まる変異体などに *Ct* を感染させ、感染根から *Ct* を再分離する。その後、各変異体に再接種する一連の流れを継続する。

【2018 年度研究結果】

(項目 1) 異なる地域・植物種から単離された 4 *Ct* 菌株については、スペイン株と比較すると若干その効果は弱い場合やバリエーションはあったものの植物生長を促すことが判明した。一方で、*Ct* の近縁種 (*C. liriopes*, *C. spaethanum*, *C. incanum*, *C. higginsianum* など) は植物生長を促した *C. spaethanum* の 1 株を除き、同一条件で植物生長を効率よく促せないか、もしくは、植物生長をむしろ阻害した。したがって、シロイヌナズナに対する植物生長促進効果は *Ct* 種が有するユニークな機能であることが考えられた。一方で、日本から単離された *Ct* の1株に関しては、シロイヌナズナの生長を阻害する菌であることを見出している。以上の結果から、*Ct* の感染戦略は異なる地域・植物への適応の結果、同種内においても共生型から寄生型まで幅広く変化することが推察された。

(項目 2) 4 種類の *Ct* 菌株、*C. liriopes*, *C. spaethanum* に関して、その全ゲノム情報を Pacbio や Illumina によるシーケンスで同定した。*Ct* 菌株間でのゲノム構造を比較すると、互いに高度に類似しており、保存された領域に関しては平均 99%以上塩基配列が一致していた。一方で、転移・逆位が見られた箇所や特定のタイプの感染戦略を示す菌特異的な領域も多数確認された。現在は、共生型もしくは寄生型菌特異的に認められる領域の同定、および、領域に存在する遺伝子情報を取得中である。

(項目 3) 4 種類の *Ct* 菌株の感染中の宿主・菌のトランスクリプトーム解析を行った。感染の初期では、寄生型 *Ct* 感染時に他の *Ct* 株の感染時とは顕著に異なる応答を示すことが判明した。一方で、共生効果も確認される感染後期においては、共生型 *Ct* 感染時に、寄生型や中立型の *Ct* 株感染時とは異なる応答を示した。菌側の解析については、高い類似度を示すゲノムを有するにも関わらず、特に感染初期において共生型と寄生型間でのトランスクリプトームが大きく異なることが判明した。他の菌株に関しても、大規模情報解析支援の枠組みで現在進行中である。

(項目 4) 共生型 *Ct* 株が病原菌化する変異体 (*cyp79B2 cyp79b3*)、その共生能が低下する変異体 (*phr1 phl1*)、さらには逆に強まる変異体 (*ein2, phl1;1 phl1;1;4*) に *Ct* を感染させ、感染根から *Ct* を再分離する実験を繰り返した。現在までに、25 回繰り返して菌株の保存が完了した。栄養培地上での生育変異は株間で認められていない。今後は、植物共生能に変化が生じているか調査する。

【2019 年度研究計画】

1. 対照的な感染戦略を示す菌株のゲノム情報をそれぞれ取得し、比較ゲノム解析により菌株間での多様性及び相同性を示すゲノム領域(遺伝子)を同定する。
2. *Ct* 菌株間で遺伝子応答パターンが異なる遺伝子群を同定する。同時に、同一菌株の中で遺伝子発現が大きく揺らぐ遺伝子群にも着目し、菌株間での保存性を上記のゲノム情報も元に明らかにする。
3. 1., 2. で絞り込んだ進化速度の速い遺伝子群が対照的な感染戦略を示す要因であるかを検証するため、植物・菌の候補遺伝子の欠損変異体を作成し、変異体における感染行動を記述する。
4. 共生型 *Ct* 株が病原菌化する変異体、及び、その共生能がさらに強まる変異体などに *Ct* を感染させ、感染根から *Ct* を再分離の流れを継続する。各 *Ct* 株の共生能に与える影響を調査する。顕著な変化が認められた菌株を中心に、ゲノム情報を取得し、比較ゲノム解析を行う。

【今後の展望】 感染戦略特異的な因子が遺伝学的に同定された後は、植物・菌側でより広い範囲での比較ゲノム解析を行い、菌株間での各遺伝子の保存状況を調査することで、共生性と寄生性の起源(どちらが進化的に先か、など)に迫りたい。また、*Colletotrichum* 属糸状菌を超えた普遍性が認められた遺伝子については、その遺伝子の機能の詳細を明らかにするとともに、その活性を操作する方法(根圏微生物叢を活用することを想定している)を考案したい。以上から、植物感染糸状菌の寄生性を押さえ込みつつ、その共生能を最大化する方法論の開発にもつながりたい。

発現量揺らぎ—適応系により探るプロテオームの制約条件とその適応—進化への影響

守屋央朗、佐伯望（岡山大学・環境生命科学研究科）

【研究目的】 細胞内のタンパク質には、その発現量の変動が適応度に強い影響を与える—強い制約を受けているものと、発現量を多少変動させても適応度に影響を与えない—制約を受けていないものがある。私たちは、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のほぼすべての種類のタンパク質を対象として、それぞれの発現量がどれくらい制約を受けているのかを、独自に開発した発現量揺らぎ—適応系 (gTOW 法) により調べてきた。その結果、大半のタンパク質の発現量は制約を受けていない一方、2%程度のタンパク質の発現量のみが強い制約を受けている事を明らかにした。本研究では、先行研究で構築されたこの発現量揺らぎ—適応系をハイスループット化することで、課題1:発現量の制約は環境により変わるのか、課題2:発現量揺らぎは適応—進化に寄与するのかを追求する。

【研究計画】 研究目的の2つの課題を追求するために、従来の発現量揺らぎ—適応系をハイスループット化し、様々な環境における発現量の制約と発現上昇による適応を並列に評価する実験系の構築を行う。実験系は、以下の3つのステップから成る。1) *S. cerevisiae* の 5,800 種類の各遺伝子を 2 μ プラスミドに連結し、それぞれを酵母に導入する(すべての遺伝子を発現量揺らぎ—適応系に乗せる)、2) この 5,800 種類の株を混合し様々な環境下で培養する(コピー数適応を一斉に行なわせる)、3) 混合培養後の細胞集団からプラスミドを回収し、各プラスミドのコピー数を次世代シーケンサーによるインサートの出現頻度により解析する(コピー数の制約と適応的コピー数を測る)。系が完成できた時点で、高温・貧栄養・薬剤存在下などの様々な環境におけるプロファイリングを行う。

【研究結果】 平成30年度中にほぼ実験系を完成させた。特に3の配列解析において、本領域の配列解析支援を受けて、ショートリードシーケンサーから Oxford Nanopore シーケンサーに切り替えることで、サンプル調製が飛躍的に簡便化された。パイロット実験として、ジヒドロ葉酸リダクターゼ拮抗阻害剤メトレキサート耐性への適応実験を解析したところ、わずか30世代でジヒドロ葉酸リダクターゼ遺伝子 (DFR1) を多コピーでもつ株が集団を独占しており、この実験系の適応性の高さを確かめることが出来た。

【今後の展望】 マイルドな環境で多サンプルの適応実験を行い、各遺伝子の発現揺らぎがどのような軌跡を辿って適応につながるのかを解析する。このため、ハイスループットに多くの条件を探索できるよう培養条件を改良している。さらに、集団全体の遺伝子コピー数だけでなく、細胞あたりのプラスミドコピー数を算出できるように、バーコード化された酵母株の構築を進めている。

ネットイツメガエル胚発生における転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎ測定

安岡 有理(理化学研究所)

【研究目的・背景】 多細胞生物ボディプランの進化をもたらす大きな原動力の一つは、胚発生期における遺伝子発現パターンの変動、すなわち遺伝子制御ネットワーク(GRN)の改変である。GRNの進化は一般的に次のような過程で起こると想定されている。(1)ゲノム中のシス制御配列の変化、(2)シス制御配列に結合する転写制御因子の種類や活性の変化、(3)標的遺伝子の発現時期・領域・量の変化、である。このシス制御配列を介した転写因子一標的遺伝子関係の進化は、進化発生学分野の大きなテーマの一つであり、特定の遺伝子の発現を制御するシス制御配列の系統間比較解析がこれまで数多くなされてきた。しかしながら、遺伝子発現制御機構の進化過程を個体内あるいは種内といったより短い時間スケールで動的に捉えるような研究は未だなされておらず、GRN進化の制約と方向性を定量的・理論的に導き出すには至っていない。そこで、本研究ではこのGRNの進化が転写因子一標的遺伝子関係の揺らぎとそれに対する応答によってもたらされているという仮説を立て、それを実験的に検証することを目指す。

【2018年度研究計画】 ネットイツメガエル近交系統のうち、2018年度は、ゲノム解読された系統と由来が同じで、安定して良質な胚を大量に得られるGolden系統を実験に用いる。

本研究では、特異抗体が十分量入手可能な転写因子の中から、脊椎動物の胚発生における発現や機能の進化的保存性が高いものとしてOtx2, Foxa2を、保存性の低いものとしてMix1, Sial1を解析対象とする。ネットイツメガエルの一対の雄雌ペアから同胞胚を約3000個得られるので、その中から約1000個をプールして転写因子のクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)解析に用いる。アンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)の顕微注入実験も同時に行い、コントロール胚と機能阻害胚をそれぞれ10個程度プールしてRNA-seq解析を行う。残ったオタマジャクシ幼生(50個程度のプール)もしくは親個体の血液を用いて、ゲノムリシーケンスを行う。

2018年度は実験系が確立され、抗体も豊富に入手可能なOtx2を第一の解析対象とし、原腸胚・神経胚・咽頭胚・オタマジャクシ幼生で実験を行い、発生ステージ間で揺らぎの大きさを比較する。一つの発生ステージにつき、3~5ペアで同じ実験を行い、近交系統内でChIP-seqピークの位置や数がどの程度揺らぎ、それが機能阻害胚での標的遺伝子の発現変動にどう影響しているのかを明らかにする。

【2018年度研究結果】 ネットイツメガエル胚を用いたChIP実験やRNA抽出、ゲノムDNA抽出の条件を検討した。その結果、ChIP実験には100-400個ほどの胚があれば充分であること、胚1個からRNA-seq解析に十分な量のRNAが抽出できること、精巣摘出後のオス個体からでもゲノムDNA抽出に十分な量の血液が得られることが明らかとなった。したがって、同胞胚を用いた1回の実験でChIP-seq解析、RNA-seq解析、ゲノムリシーケンスすべてを行うことが比較的容易となり、しかもRNA-seq解析ではコントロール群と転写因子機能阻害群とで個体間の揺らぎも考慮に入れながら揺らぎを測定することが可能となった。

これらの条件のもと、ネットイツメガエルGolden系統を用いて転写因子Otx2とその標的遺伝子との関係の揺らぎを測定する実験を行った。まずは原腸胚で実験を行い、ChIP-seqライブラリとRNA-seq解析用のtotal RNAサンプル、ゲノムリシーケンス用の親個体のゲノムDNAを合計5ペア分用意し、大規模解析支援班に送付して解析を依頼した。また、ChIP-seq解析の実験誤差とペア間での揺らぎの関係を明らかにするため、異母兄弟胚を用いたChIP-seq解析も行い、大規模解析支援班からシーケンスデータを得た。

【2019年度研究計画】 前年度に引き続き、最も実験系が確立されているOtx2の解析を今年度も優先して行う。まずは前年度得た異母兄弟胚でのChIP-seqデータ解析から、実験誤差と近交

系統内での遺伝的バックグラウンドの差、どちらが大きいのかを検討する。また、原腸胚に加えて神経胚、咽頭胚、オタマジャクシ幼生を用いた実験を行い、発生ステージ間で各揺らぎにどのような変化があるのかを検討する。さらに、Golden 系統に加えて Ivory Coast 系統でも実験を行い、結果を比較して系統間での揺らぎを検討する。

具体的な実験デザインは前年度の経験から少し改良された。ChIP-seq 解析にはネットアイツメガエルの一対の雄雌ペアから得た同胞胚100-400 個をプールして用いる。アンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)の顕微注入実験も同時に行い、コントロール胚と機能阻害胚をそれぞれ 5 個体ずつ 1 個体ごとに RNA-seq 解析を行う。このとき、外部コントロール RNA (Spike-in RNA)を加えることで 1 胚あたりの RNA 発現量を絶対定量する。さらに親個体の血液を用いて、ゲノムリシーケンスを行う。ChIP-seq データのペア間の揺らぎ、RNA-seq データの個体間およびペア間での揺らぎを測定し、ゲノムリシーケンスデータと合わせて相互の関係を明らかにする。

【今後の展望】 ゲノムリシーケンスの結果、系統内でシス制御配列にほとんど SNP が存在しないことが示されれば、ゲノム配列非依存的な転写因子結合の揺らぎ(≡個体内の揺らぎ)が検出できる。転写因子結合の揺らぎやすいシス制御配列が見つければ、特異的な DNA モチーフ配列、標的遺伝子との位置関係、標的遺伝子あたりのシス制御領域の数との関係、機能阻害胚での標的遺伝子発現変動の大きさ(=転写因子の発現制御に対する貢献度)、標的遺伝子の胚発生中の発現パターンなどに注目して、その特徴を明らかにする。Golden 系統と Ivory Coast 系統で結果を比較することで、系統間(種内)での揺らぎと系統内での揺らぎが相関するのかを検討し、近縁種のゲノム配列との比較から GRN の進化における揺らぎの役割を明らかにする。

Otx2 と同様に胚発生を通じて発現し続ける Foxa2 や、原腸胚に発現が限定される Mix1 や Sia といった転写因子についても同様の実験ができれば、転写因子の種類による揺らぎの大きさに違いについても議論できるようになる。

ゲノム倍数性がもたらす進化可能性～揺らぎと安定性の両立～

大林龍胆(理化学研究所)、畠山哲央(東京大)

【研究目的・背景】 本申請ではゲノム倍数化が進化に及ぼす影響とその過程を実験的検証により解き明かすことを目的とする。ゲノム倍数化は、現存する様々な生物種において観測される形質である。古くから倍数体生物は環境変動などへの適応能力が高いことが示唆されているが、その基本原理の解明には至っていない。ゲノム倍数化と進化との関係について、有名な仮説として大野乾によって提唱されたゲノム重複説がある。これは全ゲノム重複により冗長性が生じ、正常な遺伝子を保持したまま、コピー遺伝子を改変でき、新規形質の進化が促進されるという仮説である。この仮説に基づくとゲノム倍数化によって生じる冗長性は進化を加速させることになる。他方、進化速度を考えた場合、1細胞あたりのゲノムコピー数が多い状態では、1つのゲノムに変異が入っても、その他の正常コピーによってその効果が打ち消されるまたは弱められるため、変異の効果が表現型として現れにくい。したがってゲノム倍数化により進化速度は遅くなることになる。本申請では、これまでの理論のみに基づくと一見矛盾する、ゲノム倍数体の進化を実験生物学により定量的に捕らえ、ゲノム倍数化と進化の関係に存在する普遍原理の解明を目指す。さらに、新たなゲノム倍数化進化の数理モデルを作成することによって、ゲノム倍数化と進化の関係の普遍的な理論の構築を試みる。

【2018年度研究計画】 ゲノムの倍数化が進化に与える影響の実験的な検証にあたり、本研究ではシアノバクテリアをモデル生物として用いて、人工進化実験を行う。シアノバクテリアを用いる主なメリットとして、複数コピーゲノムであるという点の他に、1細胞あたりのゲノムコピー数が増えることが挙げられる。先行研究で、シアノバクテリアにおいて対数増殖期ではゲノム数が増え、定常期ではゲノム数が減少することがわかっている。これは、増殖に有利な環境下ではゲノムコピー数を増やし、冗長性を利用して変異を蓄積し、一方、ストレス環境下ではコピー数を減らし、揺らぎを増やすことにより進化速度を上げている、つまり、シアノバクテリアが新規形質の獲得と進化速度の上昇の両立を実現していることを暗示する。本研究では、この『ゲノムコピー数変動説』の実験的な検証を通して、ゲノムの倍数性が進化に及ぼす影響を検討する。ゲノムコピー数変動説の検証のために、本年度は、ゲノムコピー数の変動と表現型揺らぎの同時観察系を構築する。まず、複数種類の抗生物質に対する耐性遺伝子を異なるゲノム中の相同領域に挿入し、それぞれのゲノムを標識することによって、人工的にヘテロなゲノムを持ったシアノバクテリアを作出する。そして作成したヘテロゲノムを持ったシアノバクテリアを、様々な濃度の抗生物質の存在下で生育させ、どの程度の割合が生き残るかを計測することにより、表現型の揺らぎの大きさを測定する。一方、ゲノムコピー数に関してはフローサイトメトリーを用いた計測系が既に確立している。そこで、上記の手法を併用し、ゲノムコピー数が異なる2種のシアノバクテリアで、表現型揺らぎとゲノムコピー数の関係を定量的に明らかにする。また、対数増殖期と定常期の細胞で同様の解析を行う。これにより、ゲノム数の増減とともに、表現型揺らぎが実際に変化するかどうかの、基礎的なデータを得る。

【2018年度研究結果】 昨年度は定量的に複数コピーゲノムの遺伝様式を解析する構成的手法を確立した。この手法を用いてシアノバクテリアにおける複数コピーゲノムの遺伝様式を解析した結果、ある特徴的な遺伝様式が見えてきた。さらに、倍数性の異なる複数種のシアノバクテリアにおいてもこの遺伝様式は同様であることが明らかとなった。また進化シミュレーションも同時並行で解析しており、これまでに倍数性を変化させた際に進化能が大きく変動することが見えてきた。この結果は上記で示したゲノム重複説の理論的矛盾を解決しうる可能性を示唆するものである。

【2019 年度研究計画】 本年度は細胞小器官である葉緑体、ミトコンドリア(オルガネラも複数コピーゲノムを持つ)においても遺伝様式を検証し、倍数性ゲノム遺伝様式の普遍性を明らかにする。さらに、今年度は進化シミュレーションを発展、改変しながら進化理論モデルの構築を目指すとともに、人工進化実験による検証も並行しておこなう。具体的には様々なストレス環境下で倍数性の異なる複数種のシアノバクテリアを進化させ、その進化能を検証する。さらに、倍数性の異なる個体を人工的に作出することも計画しており、このような人工倍数体を用いた進化実験も計画中である。

【今後の展望】 これまでに、倍数ゲノムの新たな遺伝様式が明らかとなってきた。この結果はミトコンドリア病発症過程やオルガネラの片親遺伝を説明するうえでも興味深い結果となっており、オルガネラゲノム進化への応用も可能である。さらに、進化シミュレーションの結果は Fisher の基本定理とゲノム重複説を両立できる条件を示しており、新たな進化理論を提唱できる可能性がある。ゲノム倍数化はがん細胞や多剤耐性バクテリアにも見られる普遍的な現象であり、今後はバクテリアやオルガネラさらには細胞レベルに至るまで幅広い進化に適応できる進化原理の解明を目指す。

テントウムシ斑紋の揺らぎから探る表現型進化の制約と方向性

新美輝幸、安藤俊哉(基礎生物学研究所)

【研究目的・背景】 ナミテントウは、極めて多様性に富む斑紋多型を有する昆虫である。この多様な斑紋パターンは、単一遺伝子座に座位する複対立遺伝子により支配されており、それらの組み合わせによって決定されることが古くから明らかにされてきた。また興味深いことに、ナミテントウの紅型では温度や性に依存して黒点のサイズが揺らぐことが知られている。

本研究は、温度という環境変化に対して斑紋の黒点サイズが揺らぐ明瞭な現象を有するテントウムシに着目する。研究材料には、種・属・科のレベルで斑紋に多型性および単型性を示す各種テントウムシを用いる。我々がナミテントウにおいて同定した翅の黒色領域のパターンを決定する斑紋プレパターン遺伝子に焦点を絞り、これまでに確立した遺伝子機能解析法を活かし、斑紋プレパターン遺伝子 *pannier* の温度応答エンハンサーを通して、黒点サイズという表現型の揺らぎと斑紋多型という進化の可変性について「揺らぎ応答理論」が適用可能かを検証する。

【2018 年度研究計画】

- (1) ナミテントウにおける温度摂動による黒点サイズ応答及び *pannier* 遺伝子の発現応答の解析
- (2) 各種テントウムシにおける温度摂動による黒点サイズの応答及び *pannier* 遺伝子の発現応答の解析
- (3) 温度摂動に対する *pannier* 遺伝子発現の時空間的な動態変化の定量解析系の開発
- (4) ナミテントウにおける *pannier* 遺伝子の温度応答制御領域の同定

【2018 年度研究結果】

- (1) 翅の斑紋の黒色領域と赤色領域の面積を計測する方法を確立した。また、翅の形状の正規化や黒色領域の個体差などの詳細な解析については、理論解析支援班の協力により進めている。温度応答性を示すナミテントウの紅型について、17°C、23°C、29°Cでの蛹期間や温度感受性期を調査した。
 - (2) ナミテントウと同じ *Harmonia* 属で斑紋多型をもつクリサキテントウ、斑紋多型が存在しないナホシテントウ、ハイイロテントウ、ニジュウヤホシテントウを用いて温度摂動による黒点サイズへの影響を調査した。その結果、これらのテントウムシはいずれもナミテントウのような明確な温度応答性を示さないことが判明した。
 - (3) 温度摂動に対する *pannier* 遺伝子の発現の時空間的な動態変化を定量的に解析する実験系を開発するため、CRISPR/Cas9 を利用して *pannier* 遺伝子の第 1 イントロン領域に EGFP をノックインさせるコンストラクトを作製し、生きたまま *pannier* 遺伝子の発現活性をモニター可能なエンハンサートラップ GFP ノックイン系統の作出を進めている。
 - (4) 当研究室の先行研究から *pannier* 遺伝子の 100 kb に及ぶ第一イントロン内に主要な斑紋エンハンサーが存在すると推測されている。この中から、エンハンサー領域を絞り込むために、発生過程の翅の細胞でオープンクロマチン状態にある領域を ATAC-seq 法によって検出することを試みた。大規模解析支援のサポートによって条件検討を重ね、*pannier* 遺伝子の発現開始前のサンプルと発現開始後のサンプル間で明瞭な差が見られエンハンサー候補領域が絞り込まれた。
- 一方で、ゲノム未解読のテントウムシの *pannier* 遺伝子座の両端をゲノム編集ツール Cas9 によって切断し、200 kb に及び遺伝子座を丸ごとクローニングする CATCH 法の検討も進めた。パルスフィールド電気泳動を利用した DNA 分離装置 sage-HLS を用いて断片のクローニングを試みた。定量的 PCR 及び Oxford Nanopore sequencing によって、単離した DNA の濃縮率を調べた。その結果、効率的な濃縮条件のさらなる検討が必要であることが判明した。

【2019 年度研究計画】

- (1) 温度摂動による *pannier* 遺伝子の発現の揺らぎを定量リアルタイム PCR 法により測定することで、温度摂動による黒点サイズ応答及び *pannier* 遺伝子の発現応答との関連性を検証する。以上の解析により、*pannier* 遺伝子が黒点サイズの揺らぎをもたらす遺伝子であることを確認する。
- (2) 温度応答性を示すテントウムシを探索する。様々な系統的なレベルにある各種テントウムシの比較解析から、黒点サイズという表現型の揺らぎと斑紋多型という進化の可変性について「揺らぎ応答理論」が適用可能かを検証する。
- (3) *pannier* 遺伝子の発現活性をモニター可能なエンハンサートラップ GFP ノックイン系統を作出し、温度摂動に対する *pannier* 遺伝子の発現の時空間的な動態変化を定量的に解析する。
- (4) 条件検討が完了した ATAC-seq のサンプル調製プロトコールに基づき、高温処理・低音処理したナミテントウの翅のサンプルの ATAC-seq 解析を進め、温度応答に関わるエンハンサー領域を同定する。さらに、温度感受性を示さない別系統のナミテントウ及び別種のテントウムシの *pannier* 領域の効率的な単離・同定の為の CATCH 法の条件検討を進める。
- (5) 各種テントウムシにおける温度応答を司る *pannier* 遺伝子の発現制御領域の比較解析
- (6) テントウムシ斑紋の進化を予測する制約進化理論の構築

【今後の展望】 今後、我々が解読したナミテントウのゲノム情報を利用し、形質転換体を用いた遺伝子機能解析を行い、斑紋プレパターン遺伝子の温度変化に応答するエンハンサーを同定する。さらに、各種テントウムシを用い、斑紋プレパターン遺伝子の温度応答エンハンサーの共通性・多様性について検討する。以上の解析によって、温度感受性を示す種と示さない種の発生システムのどのような違いが環境変動による表現型の変わりやすさ(斑紋サイズのゆらぎの大きさ)の違いを生み出すのかを明らかにすることを目指す。最終的には、どの程度の量のどのような変異が別の斑紋型へのシフトに必要なかを定量的かつ質的に推定することを目指して理論支援班と議論を重ね、テントウムシの斑紋の制約や方向性を予測する制約進化理論を構築することを目指す。

第4回大規模情報解析情報交換会

重信 秀治

第4回目大規模情報解析情報交換会は、第5回領域会議と合わせて、OIST シーサイドハウスにて開催されました。

重信より、総括班大規模解析支援班が実施している、各班に対する大規模解析支援の状況を報告しました。昨年度(2018 年度)は、2017 年度からの継続課題 2 件(計画班)と 2018 年度に新規採択された課題 9 件(計画班 4 件+公募班 5 件)の支援を実施しました。支援要請が多かった多サンプルの RNA-seq は、支援班によって効率的かつ安定的なワークフローを確立することができました。すでに4つの班が数十~百サンプル以上のマルチプレックス RNA-seq のデータを産出しています。さらに、微量サンプルへの対応も進めています。多サンプル RNA-seq 以外にも、共生系における宿主・共生細菌の dual-RNA-seq、細菌叢解析、ATAC-seq、single cell RNA-seq、新規ゲノム解読、プラスミド集団解析など、幅広い支援が進行中です。また、基礎生物学研究所の共通機器として、当領域にも有用と思われる次世代シーケンシング関連機器が 2 つ導入されたことを紹介しました。10x Genomics 社の Chromium は微小流路技術と Drop-seq の技術を組み合わせ、single cell RNA-seq や、long range linked-read 解析を行うことができます。PacBio の Sequel はロングリードシーケンサーで、領域が保有する Oxford Nanopore との性格の違いを生かした適材適所の活用が期待されます。例えば、完全長 cDNA を正確に読む IsoSeq は PacBio のみが可能なアプリケーションです。

次世代シーケンシングの目覚ましい進歩のおかげで、非モデル生物の新規ゲノム解読がますます容易に、そしてますます精度よく可能になってきたことを、私たちは大規模情報解析情報交換会で毎回のよう強調しています。今回の情報交換会の後半では、研究員の真野さんが、「Hi-C によるゲノム Scaffolding」と題して、Hi-C 技術を用いた染色体レベルのゲノムアセンブルについて講演しました。Hi-C は Chromosome conformation capture 法の一つで、クロマチン構造の時空間動態の解析を次世代シーケンシングで行う技術として提唱されましたが、この技術はゲノムアセンブルにも使われるようになりました。支援班が試したプロトコルでは、次のようにイルミナライブラリを作製します。組織液体窒素中で粉砕した組織に含まれるクロマチンをまずクロスリンクします。これでゲノムの配列と 3D 構造が保たれます。クロスリンクされたクロマチンを制限酵素で消化し、5' 末端をビオチンで標識し、さらに DNA をライゲーションします。その結果、物理的に近傍にある DNA 断片どうしがライゲーションされます。それらを捕捉し、イルミナの Paired-end シーケンシングを行えば、物理的に近傍にある DNA 断片のペアの情報が得られます。同一染色体に乗っている DNA 断片は物理的にも近くに位置する確率が高く、Hi-C による chromosome conformation 情報が大局的なゲノム構造情報を与えます。今回、ゲノムが既読だが染色体レベルのアセンブルには程遠いエンドウヒゲナガアブラムシで Hi-C を試してみました。その結果、1,720 の scaffolds, N50=1Mb のアセンブルが、1,230 の scaffolds, N50=3.9Mb に大きく向上しました。アセンブルの配列としては、染色体の数(N=4)までにはなりませんが、リンク情報に基づくと見事に 4 つにクラスタリングされました。Hi-C のメリットとして、特殊な機器が不要、比較的安価、技術的に難易度の高い長鎖 DNA の精製が不要、の3点が挙げられます。Hi-C はある程度の長さ(N50)のコンティグが存在することが前提になりますので、Hi-C 単独ではゲノムアセンブルは不可能ですが、他の技術(Chromium やロングリード)と組み合わせることによって、染色体レベルのゲノム情報を得る強力な手法だと言えるでしょう。

国際活動支援について

入江 直樹

進化の方向性や制約、あるいは拘束といった問題に現在挑んでいる研究者は、世界にどのくらいいるでしょうか。あるいは、そうした知見・視点に触れることで、新たな国際共同プロジェクト、さらには進化学に新たな潮流を生み出す研究に発展しうる科学者は、世界にどれほどいるでしょうか。具体的な数字はわかりませんが、こうした世界の学者達の叡智を結集して、進化学を大きく展開させようとする班員を支援するのが、国際活動支援班の役割です。

これまでも、国際会議等での情報収集や情報発信、あるいは国際共同研究や国際学会 (AsiaEvo など) の発足・開催を支援するために、派遣や招聘、受け入れを積極的に支援してきた国際活動支援班ですが、今年度も減速することなくこうした支援を積極的に続けます。特に、「国際共同研究」に結びつける目的、そして若手研究者の国際舞台での活躍を目的としたでの派遣・招聘・受け入れは今後とも積極的に支援していく予定ですので、班員の学生さんを含めみなさん是非積極的にご応募ください。もちろん、個別の研究の補助・支援を行うものではないので、領域が目指すところにどのように学術的に貢献できうるのかを書いて頂ければと思います。

応募のための申請書は、以下の新学術領域ウェブサイトにありますので、申請書にご記入の上、info@constrained-evo.org までご提出ください。
http://constrained-evo.org/international_activity.html

灰 皿

倉谷 滋

2014 年当時執筆の未発表エッセイに、2019 年 6 月加筆したもの

本当はこのタイトル、『灰皿と進化 2014』か何かにするべきだったのだろうが、こうやってシンプルにまとめるとなんとなく高峰秀子のエッセイ調で面白いではないか。まあ、彼女は煙草なんか吸わなかったであろうし、こんなタイトルのエッセーもおそらく書かなかったであろう……と高を括っていたのだが、果たしてそうか？ 早計は禁物、秀子さんはかつて林芙美子の『放浪記』（1962 年、成瀬巳喜男監督）に主演として出ていたっけな。あの主人公は確かバンバン煙草吸っていたのではなかったか。そうそう、そんな気がしてきた。確か、銘柄はゲルベヅルテだった。それに、「カルメン故郷に帰る」のストリッパーなんかもっと吸いそうだ。こりゃあヤバイと「デコちゃん、デコちゃん……」と呟きながら我が家の書架を探し（うちの書架には何でもある）、高峰秀子関連書籍を引っ張り出してきた。フムフム……ドレドレ……、あ、やっぱり「カルメン……」で彼女はキセルを咥えている。かくして、高峰秀子は私と同じ喫煙者であった。ついでに、『コットンが好き』という彼女の本の中には、「灰皿」というエッセイがちゃんとある。おお……。

そう、灰皿の話だった。灰皿というのは哀れなもので、「皿」と呼ばれながらも其処に何か良いものが盛られるようなことはついぞ無く、大抵は見苦しい吸い殻がうず高く積もって行く運命にあるわけで、吸い殻でないものがごくまれに入れられることがあったとしても、それは珈琲のダシガラならまだまし、まずろくなものではないに決まっている。しかし、かくのごとき灰皿も黙ってはいないのである。と、まあ、この機会に灰皿を見直してみようと思うのである。

灰皿はいろいろなところに置きたいものだ。今ここで煙草を吸っていても、次の瞬間どこで吸いたくなるか分かったものではない。机の上にはもちろん、台所にも、バルコニーに

も灰皿を置きたい。生活空間を演出するのに躍起になっている身としては、「どんな灰皿を置きたいか」、「どんな灰皿で煙草を吸いたい」という、タッタそれだけのことにも心血注ぐ。ついこの間まで、「灰皿として機能すればそれで良い」と言わんばかりだったのが困ったものだ。そんな一過性凝り性の私は、とりあえず真鍮製のものが良いと先日思い立った。それも、骨董屋で売っているようなものであればなおよろしい。最近では、喫茶店でありながら煙草を吸わせないという自己矛盾な店が多いので、そんなところではまず期待できないのだが、ものわりの良い店ならいい感じの灰皿が置かれていたりする。結局、真鍮製のかなり重厚な灰皿を行きつけの骨董屋で値切り倒して買ってきた（下図）。時代物のスタンドの下に置くと、部屋の空間が引き締まる。良い買い物をしたものかわいと、独りほくそ笑んでいる。



第二に、陶器のものか。しかし下手なものを置くと、まるで安ホテルのようになってしまう。一方で、どこかの法律事務所にでも置いていそうな、あのカット硝子製の大きな灰皿は果てしなくオヤジ臭い。私なんか、最も敬遠すべきものだろう。しかも、陶器製、硝子製の灰皿は壊れやすく、またそこそこ重量もあり、探偵小説好きの筆者の目には何となく物騒でもある。

と、まあ、何事に付け物品は人に語りかけるのである。それを制御する技を「品」とかセンスとか言うのであろう。高貴なところには高貴なものを、いかがわしいところにはそれなりにいかがわしいものを置いておくべきなのだ。であるから、逆に生活の質を高めるには、そういった一見つまらぬものの選択とか、配置を考えるのが手っ取り早くて良いのである。

台所のカウンターで、カウンターチェアに座りながら色々やりたい人（私自身のことだ）、ベランダに出て手摺りにもたれ掛かりながら吸いたい向きは、背丈の高いスタンド仕様の、昔よく待合室に置いてあったような灰皿台を置くのも手かも知れない。こういうのも新品買うよりも、雑貨屋とか骨董屋で買うのが良からう。私の行きつけのトアウエストのあそこ、大丸のそばの全国チェーンのあそこ、ひょっとすると昆虫館のそばのあの店にも売っていきそうな気はするが、実際あまり見たことはない。アールデコ調のものがあつたらさぞかし気分が良からうにと思うことしきりである。

アールデコ調というのは、私にとってはほとんどもう、欧風版の「唐草模様」と言うに等しく、それは絶対に金属製でなければならない。階段やベランダの手摺り、テラスのテーブル、椅子、などと言ったものは、本来皆このデザインでなければならないとさえ思っているし、地下鉄の駅の入り口にもそんなアーチを据えるべきだと思っている。巴里自然史博物館旧館の階段も全てコレだったし、博物館を設計した人物はエッフェル塔も設計していたというから、塔のむき出し金属が唐草模様していた可能性も十分にあったわけだ。巴里の街に屹立するあの巨大な塔が、全面唐草模様のアールデコ調であしらえてあつたなら、それはそれはさぞかし面白いことになっていたであろう（そもそも、あのロココ調の巴里にあって、エッフェル塔だけがヴィクトリアン・スチームパンク調なのはどうしたわけだ？）。自然史博物館の唐草に関しては、金属がもう劣化していて、子供でも簡単に折り曲げられ、挙げ句の果てはポキリと折れてしまう程である。かくしてその博物館の手摺り、至る所唐草が「落葉」しており、「早く修復したいのだけだね、予算がなかなか無くてね」と、古生物学者の Janvier 博

士が嘆いていたのを思い出す。仮に予算が下りて改修工事をするようになったとしても、あの唐草手摺りだけは外して欲しくない。

灰皿の話だった。かくして私にとって、灰皿は単なる灰皿ではなく、机と同様、物書きとか、読書とか、私の本来やるべきことをサポートし、時には想像力を広げてくれる、誠に有り難い存在なのであって、「マナーとしての携帯灰皿」などというものは、私にとって灰皿以前の、救いようもないほど貧困な発想の産物でしかないのである（必要だから持っただけ、いちおう）。そういう便利一辺倒のアイデア商品よりむしろ、面白いのは普通の灰皿がこの世に出現した背景だろう。

先にも紹介した秀子さんは、灰皿を灰皿として使う以外にも、さまざまなものが「灰皿として使える」こと、そしてそういったものが結構重宝することをエッセイの中で指摘している。たぶん、それはご主人のことではなくご自身の経験に根ざしたことなのだろう。私も例に漏れず、硝子製のキャンドルホルダーを灰皿として使用していたことがあつたし、特に若い頃は缶コーヒーの缶を用いることも度々であった。要するに、手頃な大きさで、かつ燃えない素材のものなら、たいていのものは灰皿として使えるのだ。そこに水を入れておけばなお良い。

思えば、昔は灰皿というものの自体が存在していなかったのかも知れない。多分そうだろう。食事のための小皿とか、空き缶とか、そういったものが灰皿として重宝であることが発見され、それが二次的に改良されることによって、「灰皿」という特化したものがようやく成立したのかも知れない。おそらくその第1段階は、台所という「カオス」の中からの「便利さの発見」だろう。そして、それに続いて、「灰皿として使う物を他の容器から隔離する」ことが生じたのだろう。これにより、「灰皿」という機能モジュールは単体として成立したのである。成立したが最後、それは再び食器として用いられることはなくなったのである。つまり、特定の道具としてのアイデンティティーと制約が成立したのである。私も歳を取ってちゃんと灰皿を用意するようになったから、もはや横着して代用品で済まそうなどとは思わなくなったのである。かくして、個体発生は進化を繰り返すのである。

ところで現在、灰皿には、吸いかけの煙草を置いておくための凹みを縁のところに備えているものが多いが、実際その通りにその凹みが用いられているのをあまり見たことがない。私自身、それを用いたことは全くない。そもそも煙草1本を吸うための時間など大したものではなく、何か用事があるって煙草をそこに載せておかねばならないような忙しい状況がそんなに頻繁にあるとも思えない。もしそれがそんなに便利だとしたら、途中で煙草が転がり落ちて火事になってしまう頻度もかなり大きくなるだろう。むしろ、ない方が良くない。というわけであの凹みは、それが食事のための小鉢ではなく、灰皿であることを示す身分証のように思えてならないのだ。あるいは、それ自体が灰皿の記号の一部になっているのか。

実際、機能を失っても邪魔にならないと言うだけで残り続け、それがあってによってそのもののアイデンティティーを保障するような「無用の長物」はこの世に意外と多い。例えば、昔の学生が良く被っていた「学生帽」には、飛ばされるのを防ぐ「ベルト」が着いていたが、それが実際ベルトとして用いられているのを私は見たことがない。単なるデザインの一部なのだ。同様にセーラー服のトレードマークとなっている「セーラー襟」、もしくは俗に「ジョンベラ」と呼ばれる幅の広い襟もそうだろう。もちろんセーラー服の起原は水兵の制服であり、あの襟は強風の中での集音効果を発揮していたという説があるが、

いうまでもなく現在、それはデザインとして以上の意味はまったく持っていない。つまり、これは進化的残遺以外の何ものでもないのだ。

雑多にさまざまな道具や機材が身の回りに雑然と並べられているカオス的状况の中で、特定の行動が特定の道具と結びつき、その固定した関係が確固とした地位を確立する。スチュアート・カウフマンは、自己組織化と生物進化の文脈において、細胞の中にもみる解糖系のような、一見複雑な分子ネットワークが次第に形をなしていくさまを描いて見せているが、人間のいわゆる「道具」の発展史にも、それと似た経緯があるのかも知れない。というわけで、灰皿ひとつでもこのコラムのテーマともあながち無関係ではないというお話……。



こんなへんてこりんなものをへんてこりんな店で見つけた。右側が灰皿。

Constrained & Directional Evolution Newsletter Vol. 3 No. 2

発 行 : 2019 年 5 月 7 日

発行者 : 新学術領域研究「進化の制約と方向性～微生物から多細胞生物までを貫く表現型
進化原理の解明～」(領域代表者 倉谷 滋)

編 集 : Constrained & Directional Evolution Newsletter 編集委員会(編集責任者 深津 武馬)

領域 URL : <http://constrained-evo.org/>